

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Priv.-Doz. Dr. med. vet. Cornelia Silaghi

Habitatabhängige Prävalenzunterschiede zeckenübertragener Erreger in *Ixodes ricinus* und das Reservoirpotential von Rehwild

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Evelyn Overzier
geb. Fischer

aus Neuburg/Donau

München 2013

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Cornelia Silaghi

Korreferent/en: Prof. Dr. Armin M. Scholz
Univ.-Prof. Dr. Dr. habil. Martin Förster
Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger
Priv.-Doz. Dr. Sven Reese

Tag der Promotion: 20. Juli 2013

Die vorliegende Arbeit wurde nach §6 Abs. 2 der Promotionsordnung für die
Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München
als kumulative Dissertation gestaltet

„ [...] Manchmal hat man eine sehr lange Straße vor sich. Man denkt, die ist so schrecklich lang; das kann man niemals schaffen, denkt man. [...] Jedes Mal, wenn man aufblickt, sieht man, dass es gar nicht weniger wird, was noch vor einem liegt. Und man strengt sich noch mehr an, man kriegt es mit der Angst, und zum Schluss ist man ganz außer Puste und kann nicht mehr.

Und die Straße liegt immer noch vor einem. So darf man es nicht machen. [...]

Man darf nie an die ganze Straße auf einmal denken [...]. Man muss nur an den nächsten Schritt denken, [...], an den nächsten Besenstrich. Und immer wieder nur an den nächsten. [...]

Dann macht es Freude; das ist wichtig, dann macht man seine Sache gut. [...]

Auf einmal merkt man, dass man Schritt für Schritt die ganze Straße gemacht hat. [...] “

[Beppo der Straßenkehrer zu Momo (MOMO, Michael Ende, 1973)]

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS.....	1
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	4
I. EINLEITUNG	6
II. LITERATURÜBERSICHT	8
1. <i>Ixodes ricinus</i>.....	8
1.1. Taxonomie	8
1.2. Vorkommen	9
1.3. Lebenszyklus, saisonale Aktivität, Wirtsspektrum	9
1.4. Vektorfunktion.....	10
1.5. Rehwild (<i>Capreolus capreolus</i>) als Wirt für <i>Ixodes ricinus</i>	11
2. <i>Babesia</i> spp.....	12
2.1. Taxonomie, Morphologie	12
2.2. Entwicklungszyklus, Reservoirtiere	12
2.3. Verbreitung, Klinik.....	13
2.4. <i>Babesia</i> spp. in Rehwild	16
3. <i>Anaplasma phagocytophilum</i>.....	17
3.1. Taxonomie, Morphologie	17
3.2. Entwicklungszyklus, Reservoirwirte	17
3.3. Verbreitung, Klinik.....	18
3.4. <i>Anaplasma phagocytophilum</i> in Rehwild	19
4. <i>Rickettsia</i> spp.....	21
4.1. Taxonomie, Morphologie	21
4.2. Entwicklungszyklus, Reservoirtiere	21
4.3. Verbreitung, Klinik.....	22
4.4. <i>Rickettsia</i> spp. in Rehwild	22
5. <i>Bartonella</i> spp.	24
5.1. Taxonomie, Morphologie	24
5.2. Reservoirtiere, Verbreitung	24
5.3. <i>Bartonella</i> spp. in Rehwild	25

III.	MATERIAL UND METHODEN.....	26
1.	Standortauswahl.....	26
1.1.	Stadtgebiet München	26
1.1.1.	Englischer Garten, M2	26
1.1.2.	Nymphenburger Schlosspark, M3	27
1.2.	Dörnbergpark, R1 (Regensburg).....	27
1.3.	Schlosspark Berg, B (Berg, Starnberg).....	28
1.4.	Kerschlach, K (Pähl, Weilheim/Schongau)	28
1.5.	Angelberger Forst, T (Tussenhausen, Unterallgäu)	29
2.	Probensammlung.....	29
2.1.	Wirtssuchende Zecken	29
2.2.	Probenmaterial von Rehwild	30
2.2.1.	Gesaugte Zecken.....	30
2.2.2.	Blut-, Milz- und Hautproben	30
3.	Laborarbeiten	30
3.1.	Zeckenbestimmung	30
3.2.	Nummerierung und tabellarische Erfassung des Probenmaterials.....	31
3.2.1.	Wirtssuchende Zecken.....	31
3.2.2.	Probenmaterial von Rehwild	31
3.3.	DNA Isolierung.....	31
3.4.	Polymerase Kettenreaktion	33
3.5.	Detektion.....	36
3.6.	DNA Aufreinigung	36
3.7.	Sequenzierung.....	37
3.8.	Statistik	38
IV.	ERGEBNISSE	39
1.	Anzahl gesammelter Proben.....	39
1.1.	Wirtssuchende Zecken	39
1.2.	Probenmaterial von Rehwild	40
1.2.1.	Gesaugte Zecken.....	40
1.2.2.	Blut-, Milz- und Hautproben	40
2.	Zeckendichte	40

3.	NanoDrop	43
3.1.	Wirtssuchende Zecken	43
3.2.	Probenmaterial von Rehwild	43
3.2.1.	Gesaugte Zecken.....	43
3.2.2.	Blut-, Milz- und Hautproben	43
4.	Untersuchung auf <i>Bartonella</i> spp.....	43
5.	Publikationen	44
5.1.	Publikation 1	45
5.2.	Publikation 2	57
5.3.	Publikation 3	85
V.	DISKUSSION	104
VI.	SCHLUSSFOLGERUNG	114
VII.	ZUSAMMENFASSUNG.....	115
VIII.	SUMMARY	117
IX.	LITERATURVERZEICHNIS	119
X.	ABBILDUNGEN	142
XI.	TABELLEN	143
XII.	ANHANG	144
1.	Material	144
1.1.	Geräte.....	144
1.2.	Kits.....	144
1.3.	Nukleotide, Primer.....	144
1.4.	Chemikalien	145
2.	Sequenzen.....	145
2.1.	Sequenzvergleich des <i>18S rRNA</i> Gens von <i>B. divergens/capreoli</i>	145
2.2.	Sequenzvergleich des <i>18S rRNA</i> Gens von <i>Babesia</i> sp. EU1, <i>B. capreoli</i> und <i>B. microti</i>	146
2.3.	Sequenzvergleich des <i>16S rRNA</i> Gens von <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	147
2.4.	Rohdatentabellen	150
XIII.	DANKSAGUNG	155

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

<i>A. phagocytophilum</i>	<i>Anaplasma phagocytophilum</i>
Abb.	Abbildung
Aq. dest.	destilliertes Wasser
<i>B.</i>	<i>Babesia</i>
bp	Basenpaar
BLAST	Basic local alignment search tool
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
ct-Wert	Schwellenwert-Zyklus
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
<i>gltA</i>	Citrat Synthase Gen
ha	Hektar
H ₂ O	Wasser
IFAT	Indirekter Immunfluoreszenz Antikörpertest
Inkl.	inklusive
ITS	Intergenic transcribed spacer
<i>I. ricinus</i>	<i>Ixodes ricinus</i>
km	Kilometer
km ²	Quadratkilometer
m ²	Quadratmeter
msp	Oberflächenprotein (engl. major surface protein)
µL	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
min	Minute
mL	Milliliter
mM	Milimolar
n	Anzahl
NCBI	National Center for Biotechnology Information

ng	Nanogramm
Nr.	Nummer
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl. polymerase chain reaction)
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
<i>R.</i>	<i>Rickettsia</i>
sek	Sekunde
spp.	species pluralis
Tab.	Tabelle
Taq	thermus aquaticus (thermophiles Bakterium)
U	Einheit (engl. Unit)
u.a.	unter anderem

I. EINLEITUNG

Sowohl in der Geschichte, als auch in der Gegenwart der Menschheit spielen Zecken und zeckenübertragene Pathogene eine Rolle als Vektor und Erreger von Erkrankungen bei Mensch und Tier (Heyman et al., 2010). *Ixodes ricinus* ist die häufigste und bedeutendste *Ixodes* Zeckenart in Mitteleuropa (Eckert et al., 2008). Der mögliche Zusammenhang zwischen der vorhandenen Dichte von *I. ricinus* in einem Gebiet, den gegebenen abiotischen und biotischen Faktoren, wie dem Auftreten potentieller Reservoirwirte und der Häufigkeit zeckenübertragener Erkrankungen wurde mehrfach diskutiert (Jaenson et al., 2012; Jensen and Jespersen, 2005; Medlock et al., 2013; Scharlemann et al., 2008). In vorangegangenen Studien wurden verschiedene Standorte in und um München auf das Vorhandensein von Zecken und zeckenübertragenen Pathogenen untersucht (Leonhard, 2005; Schorn et al., 2011a; b; Silaghi et al., 2008a; b). Dabei ergab sich für *Anaplasma phagocytophilum* in Parkanlagen eine signifikant höhere Prävalenz als in Waldgebieten (Silaghi et al., 2008a). Die *Rickettsia* spp.-Prävalenz war im Gegensatz dazu in Waldgebieten signifikant höher als in Parkanlagen (Silaghi et al., 2008b). In einer Folgestudie, in der neben dem Englischen Garten (Stadtgebiet München) auch andere Parkanlagen aus unterschiedlichen Regionen in Bayern/Süddeutschland beprobt wurden, konnten standortabhängige Schwankungen der Zeckendichte und der in *I. ricinus* zu findenden Erregerspezies und Genvarianten (*Babesia* spp., *A. phagocytophilum*, *Rickettsia* spp. und *Bartonella* spp.) ermittelt werden (Schorn et al., 2011a; b). Ein Zusammenhang zwischen standort- bzw. habitatabhängiger Prävalenz einzelner Erreger und der An- oder Abwesenheit spezifischer Reservoirwirte für *I. ricinus* und zeckenübertragener Pathogene in unterschiedlichen Habitaten wurde vermutet. Diese Beobachtungen lassen die Annahme zu, dass möglicherweise unterschiedliche habitatabhängige Zyklen der beschriebenen Erregerspezies und Genvarianten in der Natur existieren. Auch bezüglich ihrer potentiellen Pathogenität für den Menschen und möglicher Reservoirwirte unterscheiden sich die beschriebenen Erregerspezies voneinander. *Babesia* sp. EU1 (auch *B. venatorum* genannt) (Herwaldt et al., 2003) und *B. microti* wurden als verursachende Spezies humaner Babesioseerkrankungen in Europa erwähnt (Hildebrandt et al., 2007). Rehwild (*Capreolus capreolus*) ist als Reservoirwirt für *B. capreoli* (Malandrin et al., 2010) und *Babesia* sp. EU1 beschrieben (Bonnet et al., 2007). Das natürliche Reservoir von *B. microti* wird dagegen vor allem in kleinen Säugetieren vermutet (Duh et al., 2003). *A. phagocytophilum* ist das verursachende Agens der granulozytären Anaplasmosen, an welcher neben dem Menschen (Petrovec et al., 1997) unter anderem Pferde (*Equus caballus*) (Silaghi et al., 2011f), Hunde (*Canis lupus familiaris*) (Kohn et al., 2011), Katzen (*Felis domesticus*)

(Heikkilä et al., 2010) und Rinder (*Bos taurus*) (Nieder et al., 2012) erkranken können. Vor allem Wildwiederkäuer werden als mögliches Reservoir für *A. phagocytophilum* angesehen (Alberdi et al., 2000; Masuzawa et al., 2011; Silaghi et al., 2011b). *Rickettsia* spp. sind Auslöser zeckenübertragener Rickettsiosen in Menschen (Dobler and Wölfel, 2009). Ein natürlicher Wirbeltier-Reservoirwirt für *Rickettsia* spp. konnte bis jetzt nicht definiert werden, aber Nager und andere kleine Säugetiere wurden bereits für *R. helvetica* angeführt (Schex et al., 2011). Auch *Bartonella* spp. sind als auslösende Pathogene menschlicher Erkrankungen bekannt, wie z.B. der „Katzenkratzkrankheit“ (Mosepele et al., 2012). Der Nachweis einzelner *Bartonella*-Spezies in Haus- und Wildwiederkäuern (Bermond et al., 2002; Chang et al., 2000; Dehio et al., 2001) bietet Anlass zur weiteren Erforschung der möglichen Reservoirfunktion von Rehwild.

Um eine adäquate Risikoabschätzung zeckenübertragener Erkrankungen für die Bevölkerung und Haus- und Nutztiere vornehmen zu können, ist es wichtig, Daten zur Prävalenz der einzelnen Erreger in wirtssuchenden *I. ricinus* zu erheben. Außerdem ist Wissen über mögliche Reservoirwirte einzelner Pathogene und eventuell vorhandene unterschiedliche Kreisläufe in der Natur unerlässlich. Gibt es Hinweise auf Zyklen, die „Haustier-“, „Nutztier-“ oder „Wildtier-“ assoziiert sein könnten? Gibt es einen Unterschied im Auftreten bestimmter Erreger in verschiedenen Habitaten?

Die Ziele dieser Studie waren daher:

- a) die Ermittlung der Dichte wirtssuchender *I. ricinus* in drei unterschiedlichen Habitaten (Parkanlagen, Weide, Wald)
- b) die Ermittlung der Prävalenz von *Babesia* spp., *A. phagocytophilum* und *Rickettsia* spp. in wirtssuchenden *I. ricinus* aus diesen drei Habitaten
- c) die Untersuchung von Rehwild als potentielltem Reservoirwirt für *Babesia* spp., *A. phagocytophilum*, *Rickettsia* spp. und *Bartonella* spp.
- d) die Ermittlung partieller *16S rRNA* Genvarianten von *A. phagocytophilum*

Somit soll diese Studie dazu beitragen, das Wissensspektrum über zeckenübertragene Pathogene in wirtssuchenden *I. ricinus* in Deutschland zu erweitern, mögliche habitatabhängige Prävalenzunterschiede aufzudecken und die vorhandenen Kenntnisse zu potentiellen Reservoirwirten für diese Pathogene auszubauen. Die Ergebnisse werden eine Basis für zukünftige Risikoabschätzungen und effektive Kontrollmaßnahmen bieten.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. *Ixodes ricinus*

1.1. Taxonomie

Im Reich der Eukaryota gehört *I. ricinus* (gr., lat.= das „klebrige Ungeziefer“) im Unterreich Animalia zum Stamm der Arthropoda (Gliederfüßer) (Abb. 1). Unter diesen befinden sich zahlreiche Ektoparasiten und Vektoren von Krankheitserregern. Typische Merkmale dieses Stammes sind unter anderem ein Außenskelett, welches während der Entwicklung vom Larval- zum Adultstadium durch Häutung erneuert wird, gegliederte Extremitäten, ein offenes Blutgefäßsystem, Mundwerkzeuge und die meist geschlechtliche Fortpflanzung (Eckert et al., 2008).

Abb. 1: Taxonomische Einordnung von *I. ricinus* [modifiziert nach (Eckert et al., 2008; Poljak, 2012)]

Unterstamm:	Amandibulata (Chelicerata)
Klasse:	Arachnidea
Unterklasse:	Acari (ca. 30 000 Arten)
Ordnung:	Metastigmata (Ixodida) (ca. 880 Arten)
Familie:	Ixodidae (Schildzecken)
Gattung:	<i>Ixodes</i> (ca. 250 Arten)
Art:	<i>Ixodes ricinus</i>
Gattung:	<i>Amblyomma</i> (ca. 140 Arten)
Gattung:	<i>Anocentor</i>
Gattung:	<i>Dermacentor</i> (ca. 35 Arten)
Gattung:	<i>Haemaphysalis</i> (ca. 165 Arten)
Gattung:	<i>Hyalomma</i> (ca. 25 Arten)
Gattung:	<i>Rhipicephalus</i> (ca. 80 Arten)
Familie:	Argasidae (Lederzecken)
Gattung:	<i>Argas</i>
Gattung:	<i>Carios</i>
Gattung:	<i>Ornithodoros</i>
Gattung:	<i>Otobius</i>
Familie:	Nutallielidae

1.2. Vorkommen

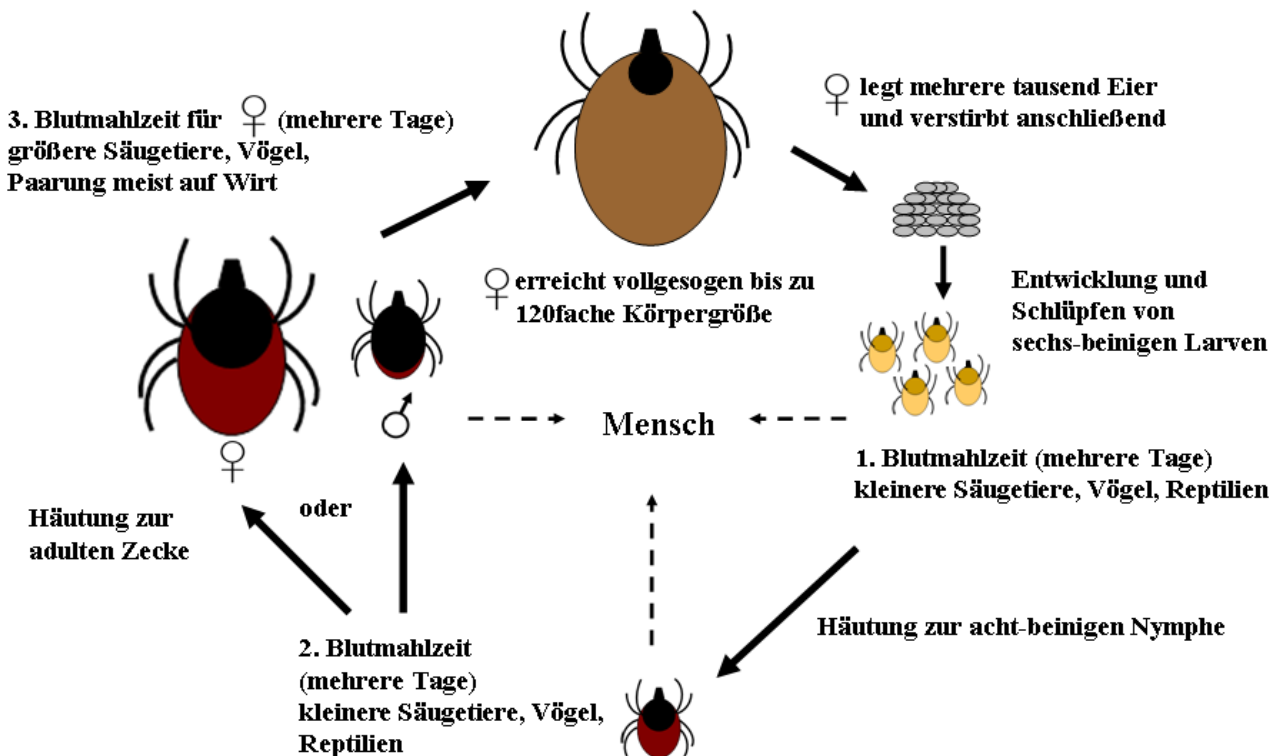
I. ricinus ist die häufigste und bedeutendste *Ixodes* Art in Mitteleuropa und vor allem in Habitaten mit relativer Luftfeuchtigkeit >75%, dauerhafter Beschattung und permanent feuchter Detritusschicht zu finden (Eckert et al., 2008).

1.3. Lebenszyklus, saisonale Aktivität, Wirtsspektrum

I. ricinus-Zecken besitzen einen drei-wirtigen Lebenszyklus, welcher drei parasitäre Stadien während der Blutmahlzeiten an unterschiedlichen Wirten beinhaltet (Eckert et al., 2008; Randolph, 2004; Sonenshine, 1991). Jede Entwicklungsstufe von *I. ricinus* zeigt eine bimodale saisonale Aktivität, mit Höhepunkt im Frühjahr (~Mai-Juni) bzw. Herbst (~September) (Eckert et al., 2008; Sonenshine, 1993), aber sogar in milden Wintern können wirtssuchende Zecken gefunden werden (Dautel et al., 2008). Durch günstige Witterungsbedingungen (Wärme, Feuchte, Windstille) aktiviert, suchen sie als „Wegelagerer“ erhöhte Stellen, wie z.B. Gräser oder Stängel auf, um auf potentielle Wirte zu warten und sich von diesen abstreifen zu lassen. Während dieser Wartezeit hilft das Exponieren des Hallerschen Organs der Zecke bei der Ortung eines potentiellen Wirtes in bis zu 5m Entfernung (Eckert et al., 2008; Sonenshine, 1991). Das Wirtsspektrum umfasst ca. 200 Wirbeltierarten und reicht von Kleinsäugetieren, Reptilien und Vögeln über größere Säuger wie Füchse (*Vulpes vulpes*), Hunde (*Canis lupus familiaris*) und Schafe (*Ovis aries*) bis hin zu Rehen (*Capreolus capreolus*), Rindern (*Bos taurus*) und dem Menschen (*Homo sapiens*). *I. ricinus* befällt bei Tieren vor allem die dünnhäutigen Stellen an Kopf, Inguinal- und Perinealregion und an den Innenflächen der Vorder- und Hinterbeine (Eckert et al., 2008). Bis die passende Stelle zur Blutaufnahme am Wirt gefunden ist, können mehrere Stunden vergehen. Anschließend ermöglicht das Durchschneiden der Haut mit den Chelizeren eine Verankerung des langen Hypostoms der Zecke im Wirt. Der Saugakt kann einige Tage bis mehrere Wochen dauern. Die aufgenommene Blutmenge wird eingedickt, indem überschüssige Flüssigkeit aus dem aufgenommenen Blut und Stoffwechselprodukten der Zecke in Form von Zeckenspeichel in den Wirt „entsorgt“ wird. Dabei werden die erfolgreiche Blutgerinnung und Entzündungs- und Immunreaktionen des Wirtes durch verschiedene Stoffe im Zeckenspeichel unterbunden. Während die Männchen kein bzw. nur wenig Blut zu sich nehmen, saugen die Weibchen bis sie das ca. 120-fache ihrer ursprünglichen Körpergröße erreichen (Eckert et al., 2008; Sonenshine, 1991). Der Befall mit Zecken kann beim Wirt zu Anämie und dadurch bedingter erhöhter Erkrankungshäufigkeit führen (Pfäffle et al., 2009). Die Häutung von *I. ricinus* zwischen den einzelnen Blutmahlzeiten und Entwicklungsphasen ist temperaturabhängig und vollzieht sich ebenso wie die Eiablage des Weibchens fernab vom Wirt

am Boden (Randolph, 2004; Sonenshine, 1991, 1993). Die Anzahl an Eiern, die das Weibchen ablegt, steigt mit dem Volumen der vorher aufgenommenen Blutmahlzeit. Es werden vier Entwicklungsphasen unterschieden: Ei, Larve, Nymphe und adulte Zecken (weiblich und männlich) (Abb. 2). Die Vollendung des Lebenszyklus vom Schlüpfen der Larven bis zur Eiablage kann 1 bis 6 Jahre betragen (Sonenshine, 1991, 1993).

Abb. 2: Lebenszyklus von *I. ricinus* [modifiziert nach (Eckert et al., 2008; Poljak, 2012)]



1.4. Vektorfunktion

Vier verschiedene Übertragungswege von Krankheitserregern zwischen Zecken sind beschrieben (Eckert et al., 2008).

- stadial (intrastadial bzw. Persistieren des Erregers zwischen ein bis zwei Zeckenstadien)
- transovariable bzw. vertikale Übertragung (von weiblicher Zecke auf Eier und folgende Stadien, über mehrere Generationen)
- Simultan-Infestation bzw. Co-feeding (zwischen zwei benachbart saugenden Zecken)
- sexuelle Übertragung (mittels Spermatophoren während Kopulation von Zecken-Männchen auf –Weibchen)

I. ricinus besitzt Vektorfunktion für Protozoen wie *B. divergens*, *B. capreoli*, *Babesia* sp. EU1 (auch *B. venatorum* genannt) und *B. microti* (Heyman et al., 2010), aber auch für bakterielle Erreger wie z.B. *A. phagocytophilum* (Heyman et al., 2010; Rikihisa, 1991), *R. helvetica* und *R. monacensis* (Socolovschi et al., 2009) und Viren, wie das die Frühsommer-Meningoenzephalitis auslösende FSME-Virus (Charrel et al., 2004).

1.5. Rehwild (*Capreolus capreolus*) als Wirt für *Ixodes ricinus*

Entsprechend seiner Verbreitung in Europa, ist *I. ricinus* die überwiegend auf Rehwild zu findende Zeckenart (Carpi et al., 2008; Kiffner et al., 2010; Vázquez et al., 2011; Vor et al., 2010). Rehe stellen aufgrund ihrer Vorliebe für Dickicht und der tagaktiven Lebensweise mit Phasen der Nahrungsaufnahme und des Ruhens, leicht zu erreichende Wirtstiere für Zecken dar und tragen durch ihre kilometerlangen Wanderungen zu deren Verbreitung bei (Vor et al., 2010). Mögliche Abhängigkeiten der zu findenden Dichte von *I. ricinus* von der Rehdichte in einem Gebiet wurden bereits diskutiert (Jensen et al., 2000). Da Wildwiederkäuer einen der vorherrschenden Wirte für *I. ricinus* darstellen, scheint es nachvollziehbar, dass die Zunahme der Rehpopulationen unter anderem einen Grund für steigende *I. ricinus* Zahlen und die Ausbreitung dieser Zecken in Schweden, Dänemark und Großbritannien darstellen kann (Jaenson et al., 2012; Jensen and Jespersen, 2005; Medlock et al., 2013; Scharlemann et al., 2008). Alle Stadien von *I. ricinus* können auf Rehen gefunden werden, wobei Nymphen und weibliche Adulte den Hauptanteil darstellen (Kiffner et al., 2010, 2011; Vázquez et al., 2011; Vor et al., 2010). Durchschnittlich können ca. 65 *I. ricinus* pro Individuum gefunden werden (Kiffner et al., 2010, 2011). Beschriebene Maxima liegen bei bis zu 2.072 *I. ricinus* pro Reh (Tälleklint and Jaenson, 1997). Die Anzahl der auf einem Individuum vorhandenen Larven nimmt mit zunehmendem Alter (kürzere Ruhephasen und dickere Haut) der Rehe bei Vor et al. (2010) ab, wohingegen die Anzahl adulter Zecken mit steigendem Alter (und zunehmender Körpermasse) der Rehe zu wachsen scheint (Kiffner et al., 2011; Vázquez et al., 2011; Vor et al., 2010). Männliche Rehe scheinen stärker von Zecken befallen zu sein (Kiffner et al., 2011; Vázquez et al., 2011). Dieser Unterschied kann aber möglicherweise durch die unterschiedlich saisonale Bejagung der beiden Geschlechter dieser Wildart und die Schwankungen in der jahreszeitlichen Aktivität von *I. ricinus* und dadurch bedingt des Zeckenbefalls auf Rehwild begründet sein (Kiffner et al., 2011; Vor et al., 2010). Anzeichen einer gesundheitlichen Beeinträchtigung der Rehe, hervorgerufen durch den Zeckenbefall, wurden bei Vor et al. (2010) nicht wahrgenommen. Die Frage, ob das Auftreten von Zecken und zeckenübertragenen Erkrankungen in der Bevölkerung mit der jeweilig geographisch vorhandenen Rehwildichte in Zusammenhang gebracht werden kann, ist

noch nicht vollends geklärt (Vor et al., 2010). Die Vermutung, dass eine Zunahme und geographische Verbreitung der Rehwild- und infolgedessen der *I. ricinus*-Populationen zu einer erhöhten Gefahr für die Bevölkerung führen kann mit zeckenübertragenen Pathogenen in Kontakt zu kommen, ist jedoch plausibel (Jaenson et al., 2012; Medlock et al., 2013).

2. *Babesia* spp.

2.1. Taxonomie, Morphologie

Im Gegensatz zu den anderen in dieser Arbeit untersuchten prokaryotischen bakteriellen Erregern zählen Babesien zu den Eukaryoten und hier zum Reich der einzelligen Lebewesen (=Protozoen). Unter den Einzellern werden sie zum Stamm der parasitären Apicomplexa (auch Sporozoa) in die Ordnung der Piroplasmen (=Piroplasmida) und neben der Gattung *Theileria* als Gattung *Babesia* in die Familie der Babesiidae eingegliedert (Homer et al., 2000; Hunfeld et al., 2008).

Babesien sind Parasiten des Blutes und in den Erythrozyten ihres Wirtes zu finden (Homer et al., 2000). Morphologisch wird zwischen kleinen ($<2,5\mu\text{M}$) und großen Babesien ($>2,5\mu\text{M}$) unterschieden. Auch phylogenetisch trifft diese vorgenommene Gruppeneinteilung zu, die eine engere Verwandtschaft der kleinen Babesien als der großen zur Gattung der *Theileria* aufzeigt. Eine Ausnahme hiervon ist *B. divergens*. Diese wird anhand ihrer Größe von $0,4\text{--}1,5\mu\text{m}$ zu den kleinen Babesien gerechnet, gehört phylogenetisch aber den großen Babesien an (Homer et al., 2000; Hunfeld et al., 2008). Eine eng verwandte, morphologisch nicht zu unterscheidende Spezies dieser Art ist *B. capreoli*, welche sich molekularbiologisch in nur drei Basenpaaren vom 18S rRNA Gen von *B. divergens* unterscheidet (Malandrin et al., 2010). Die intrazellulären Stadien der Babesien sind mikroskopisch im Blutausstrich als einkernige, birnen- oder tropfenförmige Merozoiten meist paarweise im Zytoplasma der Wirbeltier-Erythrozyten zu erkennen (Eckert et al., 2008).

2.2. Entwicklungszyklus, Reservoirtiere

Babesien benötigen für die erfolgreiche Vollendung ihres Entwicklungszyklus zwei Wirte: ein Wirbeltier, auf welches über den Zeckenstich Sporozoiten übertragen werden und in dessen Erythrozyten die Entwicklung asexueller Stadien (Trophozoiten und Merozoiten) von statten geht und einen Zeckenwirt, in dem sich nach der Blutmahlzeit die sexuellen Stadien [männliche und weibliche Gamonten (Strahlenkörper)] entwickeln, welche Zygoten bilden. Die Zygoten

differenzieren sich zu Kineten und Sporokineten. Diese wandern über die Hämolymphe in verschiedene Körperzellen ein, unter anderem in die Speicheldrüsen der Zecke und in die Oozyten des Ovars (Eckert et al., 2008; Homer et al., 2000). Nach einer transovariellen Übertragung der Babesien (von der weiblichen Zecke auf ihre Eier) auf die nachfolgende Generation kommt es bei der Larve zur Bildung infektiöser Sporozoiten in den Speicheldrüsen. Über den Stich und den Speichel der Zecke bei der nachfolgenden Blutmahlzeit erfolgt die mögliche Übertragung auf den nächsten Wirt (Eckert et al., 2008; Süss et al., 2004). Neben der transovariellen Übertragung verschiedener *Babesia*-Spezies erfolgt auch eine transstadiale Weitergabe (vom vorangegangenen zum nächsten Entwicklungsstadium der Zecke). Eine Ausnahme davon stellt *B. microti* dar, deren Weitergabe wie bei den Theilerien nicht transovariell und nur eingeschränkt transstadial erfolgt (Eckert et al., 2008). Bedingt durch die transovarielle und transstadiale Weitergabe der Babesien scheint eine Infektion auch ohne erneute Aufnahme des Pathogens mit einer Blutmahlzeit innerhalb einer Zeckenpopulation eine gewisse Zeit bestehen zu bleiben (Zintl et al., 2003). Somit muss *I. ricinus* als bedeutendes Reservoir für einzelne *Babesia*-Spezies wahrgenommen werden (Heyman et al., 2010; Zintl et al., 2003). Neben der Zecke sind wichtige Reservoirs für Babesien unter den Nutz- und Wildtieren zu finden. Rehe stellen z.B. ein natürliches Reservoir für *B. capreoli* (Malandrin et al., 2010), aber vermutlich auch für *Babesia* sp. EU1 (auch *B. venatorum* genannt) dar (Bonnet et al., 2007; Duh et al., 2005). Verschiedene Mäusearten wie die Rötelmaus (*Myodes glareolus*) (Beck et al., 2011; Duh et al., 2003; Tadin et al., 2012), die Waldspitzmaus (*Sorex araneus*) (Bown et al., 2011), die Erdmaus (*Microtus agrestis*) (Bown et al., 2011), die Feldmaus (*Microtus arvalis*), die Sumpfmaus (*Microtus oeconomus*) (Siński et al., 2006) und die Gelbhalsmaus (*Apodemus flavicollis*) (Beck et al., 2011; Duh et al., 2003; Siński et al., 2006; Tadin et al., 2012) werden als Wirte für *B. microti* angesehen.

2.3. Verbreitung, Klinik

Unterschiedlich hohe Prävalenzen von *Babesia* spp. in wirtssuchenden *I. ricinus* wurden in verschiedenen Ländern dokumentiert (Tab. 1).

Tab. 1: *Babesia* spp.-Prävalenz in wirtssuchenden *I. ricinus* in verschiedenen Habitaten und europäischen Ländern ¹⁾

Habitat	Land	Untersuchungs- zeitraum	Prävalenz	Gefundene Spezies ³⁾	Referenz
Parkanlagen	Deutschland	2009-2010	0,4-0,7% ²⁾	<i>Babesia</i> sp. EU1, <i>B. divergens</i> , <i>B. gibsoni</i> -like	(Schorn et al., 2011b)
Weide	Belgien	2010	7,9%	<i>Babesia</i> sp. EU1	(Lempereur et al., 2012)
Wald	Frankreich	2008	1,3 ²⁾	<i>Babesia</i> sp. EU1	(Reis et al., 2011)
Wald	Polen	2005-2007 2010-2011	1,6% ²⁾	<i>B. microti</i> , <i>Babesia</i> sp. EU1	(Welc-Fałęciak et al., 2012)
Wald	Schweiz	2006-2008	1,7%	<i>B. venatorum</i> , <i>B. microti</i> , <i>B. divergens</i>	(Gigandet et al., 2011)
Wald	Westschweiz	2009-2010	1,9%	<i>B. venatorum</i> , <i>B. divergens</i> , <i>Babesia</i> spp.	(Lommano et al., 2012)
Wald	Deutschland	2006-2007	5,0%	<i>B. microti</i> , <i>B. divergens</i>	(Hildebrandt et al., 2010b)
Wald	Frankreich	2006-2007	6,1%	<i>Babesia</i> spp.	(Cotté et al., 2010)
unter- schiedlich	Ungarn	2006-2008	0,3-0,5% ²⁾	<i>B. microti</i> , <i>B. divergens</i>	(Egyed et al., 2012)
unter- schiedlich	Norwegen	2006-2008	0,9%	<i>B. venatorum</i> , <i>B. divergens</i> , <i>B. capreoli</i>	(Øines et al., 2012)
unter- schiedlich	Weißrussland	2009	1,7%	<i>B. microti</i> , <i>B. venatorum</i>	(Reye et al., 2013)
unter- schiedlich	Luxemburg	2007	2,7%	<i>Babesia</i> sp. EU1, <i>B. microti</i> , <i>B. divergens</i>	(Reye et al., 2010)
unter- schiedlich	Deutschland	2009	4,1%	<i>Babesia</i> sp. EU1, <i>B. microti</i> , <i>B. divergens</i> , <i>B. capreoli</i>	(Silaghi et al., 2012b)
unter- schiedlich	Deutschland	2008	8,9%	<i>B. microti</i> , <i>B. divergens</i>	(Franke et al., 2011)
unter- schiedlich	Deutschland	2007	10,7%	<i>B. microti</i> , <i>B. divergens</i>	(Franke et al., 2010)

1) Prävalenzen aus Publikationen ab 2010 (nicht erschöpfend),

Prävalenzen aus älteren Publikationen siehe (Poljak, 2012)

2) gepoolte Proben enthalten

3) *Babesia* sp. EU1 entspricht *B. venatorum*

Sowohl einzelne Babesien aus der Gruppe der großen, als auch der kleinen Babesien werden als potentiell pathogen für den Menschen angesehen (Homer et al., 2000). Verschiedene *Babesia*-Spezies können in domestizierten Tieren wie Rindern, Schafen, Ziegen (*Capra aegagrus hircus*), Pferden (*Equus caballus*), Hunden und Katzen (*Felis domesticus*), aber auch in Wildtieren wie Mäusen und Rehwild gefunden werden (Schnittger et al., 2012). Rinder in tropischen und subtropischen Regionen erkranken meist an Infektionen hervorgerufen durch *B. bovis* und *B. bigemina*, die Babesiose des Rindes in Europa wird dagegen hauptsächlich durch *B. divergens* verursacht. Dieses Vorkommen unterschiedlicher Erregerspezies hängt vom jeweils vorkommenden Zecken-Vektor der Gattung *Rhipicephalus* und *Boophilus* in den Tropen und Subtropen bzw. *I. ricinus* in Europa ab (Schnittger et al., 2012). Während sich bei einer Infektion durch *B. bovis* befallene Erythrozyten vor allem in Gehirn und Lunge ansammeln und daher geringere Erregerzahlen im Blut gefunden werden (Schnittger et al., 2012), tritt bei Infektionen hervorgerufen durch *B. bigemina* und *B. divergens* eine drastische Zerstörung der Erythrozyten durch massive Vermehrung des Erregers auf (Bock et al., 2004; Schnittger et al., 2012; Zintl et al., 2003). Im Vergleich zu den eben genannten *Babesia*-Spezies besitzt *B. capreoli* trotz enger Verwandtschaft zu *B. divergens* wohl keinen infektiösen Charakter für Rinder und weist kein zoonotisches Potential auf (Malandrin et al., 2010).

Babesiose-Erkrankungen des Menschen in Europa werden vor allem durch *B. divergens* (meist nach Splenektomie) und in anderweitig abwehrgeschwächten Menschen verursacht (Homer et al., 2000). Nachweise aus immunkompetenten Patienten sind ebenfalls beschrieben (Martinot et al., 2011). Daneben sind vereinzelt Babesiose-Fälle bekannt, in denen *Babesia* sp. EU1 (Häselbarth et al., 2007; Herwaldt et al., 2003) oder *B. microti* (Hildebrandt et al., 2007; Meer-Scherrer et al., 2004) als verursachende Spezies beschrieben wurde. Im Falle europäischer Babesiose wurden schwerwiegendere Symptome durch *B. divergens* als durch *B. microti* hervorgerufen (Homer et al., 2000). Die Pathogenität der Spezies *B. microti* in Europa wurde von Gray (2006) in Frage gestellt und der Erregernachweis der ersten beschriebenen humanen *B. microti* Erkrankung in Europa von ihm als nicht überzeugend bezeichnet (Gray, 2006; Meer-Scherrer et al., 2004). Da *B. microti* in den USA im Gegensatz zu Europa die vorrangig zu findende *Babesia*-Spezies in humanen Erkrankungen darstellt (Herwaldt et al., 2012; Homer et al., 2000), wird die geographische genetische Heterogenität dieser Spezies diskutiert (Goethert and Telford, 2003; Gray, 2006).

Während die Inzidenz der Babesiose in Europa relativ gering ist (Homer et al., 2000; Hunfeld et al., 2008), wurden im Jahr 2011 aus den USA 1.124 Neuerkrankungen (847 bestätigte Fälle und 277 Verdachtsfälle) gemeldet (Herwaldt et al., 2012). Die Übertragung erfolgt in Europa durch

den Vektor *I. ricinus*, kann aber vor allem beim Menschen auch durch Transfusion kontaminierten Blutes stattfinden (Leiby, 2011; Oz and Westlund, 2012; Schnittger et al., 2012). Die Babesiose tritt je nach Alter, immunologischer Abwehrbereitschaft, Vorerkrankungen oder genetischer Prädisposition des Wirtes in unterschiedlichen Schweregraden in Erscheinung (Schnittger et al., 2012). Während eine akute Erkrankung 1-3 Wochen nach Infektion durch unspezifische Symptome einer Allgemeinerkrankung (wie z.B. Fieber, Abgeschlagenheit, Appetitlosigkeit, Kopfschmerz, gastro-intestinale und respiratorische Symptome), aber auch durch spezifische Symptome (wie z.B. Anämie, Hämoglobinurie und Gelbsucht, hervorgerufen durch die massive Zerstörung der Erythrozyten) begleitet wird (Heyman et al., 2010; Homer et al., 2000; Hunfeld et al., 2008), ist eine chronische Infektion üblicherweise symptomlos (Schnittger et al., 2012). In schwerwiegenden Erkrankungsfällen können diese Symptome bis zum Nieren- oder Herzversagen und zu Sterblichkeitsraten von 42% führen (Heyman et al., 2010; Homer et al., 2000; Hunfeld et al., 2008). Selten werden auch neurologische Störungen beobachtet (Eckert et al., 2008).

Der Nachweis des Erregers kann sowohl direkt als auch indirekt erfolgen. Direkte Nachweise dienen zur Bestätigung des Pathogens mittels Blutausschick und/oder PCR, während im indirekten Verfahren die Detektion einer vorangegangenen oder bestehenden akuten oder chronischen Infektion mittels Antikörpernachweis (IFAT, ELISA) möglich ist (Eckert et al., 2008; Homer et al., 2000).

2.4. *Babesia* spp. in Rehwild

In verschiedenen Studien wurde folgende *Babesia* spp.-Prävalenz in Rehwild (Blut und/oder Milz) beschrieben: 8,7% in Spanien (Garcia-Sanmartin et al., 2007), 26% in der Schweiz (Hoby et al., 2009), 30% in Polen (Skotarczak et al., 2008), 31% in Italien (Tampieri et al., 2008), 31,6% in Österreich (Silaghi et al., 2011a) und 77% in Slowenien (Duh et al., 2005). Dabei wurden *B. divergens*, *B. capreoli* und *Babesia* sp. EU1 nachgewiesen.

B. capreoli positive Rehe zeigen in den überwiegenden Fällen keine klinisch sichtbaren Symptome (Hoby et al., 2009). Unter Umständen kann eine *B. capreoli*-Infektion für das einzelne Reh tödlich sein; der Erreger scheint jedoch keine Gefährdung für Viehbestände oder Menschen darzustellen (Vor et al., 2010).

3. *Anaplasma phagocytophilum*

3.1. Taxonomie, Morphologie

A. phagocytophilum gehört in der Ordnung Rickettsiales als α -Proteobakterium zur Familie Anaplasmataceae, welche zwingend eukaryotische Wirtszellen zur Replikation benötigen (Dumler et al., 2001; Rikihisa, 1991, 2011; Woldehiwet, 2010). Im Jahr 2001 fand eine taxonomische Neuorganisation dieser Familie statt, während der die Arten *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia phagocytophilum* und der Erreger der humanen granulozytären Ehrlichiose zur Art *A. phagocytophilum* zusammengefasst wurden (Dumler et al., 2001).

Diese gramnegativen, unbeweglichen, pleomorphen Erreger replizieren in intrazytoplasmatischen Vakuolen in Granulozyten und sind mikroskopisch als sogenannte Morulae (Makrokolonien) sichtbar (Rikihisa, 1991; Woldehiwet, 2010).

3.2. Entwicklungszyklus, Reservoirwirte

Da eine transovariable Übertragung im Zeckenwirt nicht stattfindet und *A. phagocytophilum* ausschließlich transstadial übertragen wird, sind natürliche Reservoirwirte zur Aufrechterhaltung des Lebenszyklus notwendig (Doudier et al., 2010; Ogden et al., 1998). Während in den USA vor allem die Weißfußmaus (*Peromyscus leucopus*) und der Weißwedelhirsch (*Odocoileus virginianus*) als Reservoirtiere beschrieben sind (Doudier et al., 2010), werden in Europa natürliche Reservoirs vor allem in Rehwild und Rothirschen (*Cervus elaphus*) vermutet (Alberdi et al., 2000; de la Fuente et al., 2005b; Silaghi et al., 2011b; Žele et al., 2012). Neben kleinen Säugetieren wie z.B. der Waldmaus (*Apodemus sylvaticus*), der Gelbhalsmaus, der Waldspitzmaus (Liz et al., 2000), der Rötelmaus (Hartelt et al., 2008; Liz et al., 2000), der Erdmaus (Hartelt et al., 2008), dem Igel (*Erinaceus europaeus*) (Silaghi et al., 2012a) und dem Hasen (*Lepus europaeus*) (Hulinská et al., 2004), zählen auch Füchse, Wildschweine (*Sus scrofa*) (Petrovec et al., 2003; Žele et al., 2012), Braunbären (*Ursus arctos*) (Žele et al., 2012) und Vögel (Daniels et al., 2002; de la Fuente et al., 2005b; Doudier et al., 2010; Franke et al., 2010) zu den möglichen wildlebenden Reservoirtieren. De la Fuente et al. (2005b) konnte DNA von *A. phagocytophilum* in 8 von 18 untersuchten Vogelarten nachweisen, unter anderem in Amseln (*Turdus merula*), Buchfinken (*Fringilla coelebs*), Haus- (*Passer domesticus*) und Weidensperlingen (*Passer hispaniolensis*), Zippammern (*Emberiza cia*), Rotkopfwürgern (*Lanius senator*), Elstern (*Pica pica*) und Schwanzmeisen (*Aegithalos caudatus*). Unter den domestizierten Tieren wurden vor allem in Stadtgebieten Hunde als mögliches Reservoir diskutiert (Jensen et al., 2007; Kohn et al., 2011; Schorn et al., 2011a). Auch in Tieren wie

Schafen und Rindern kann der Erreger über die Phase der Erkrankung persistieren. Somit sind möglicherweise auch unter den Nutztieren Reservoirs zu finden (Woldehiwet, 2008, 2010).

3.3. Verbreitung, Klinik

1994 wurde aus den USA der erste Fall von humaner granulozytärer Anaplasiose beschrieben (Chen et al., 1994; Doudier et al., 2010), 1997 aus Europa (Petrovec et al., 1997). In den USA stieg die Inzidenzrate von *A. phagocytophilum* mit Einführung der Meldepflicht im Jahr 1999 von 1,4 Fälle/Million Einwohner/Jahr im Jahr 2000 auf 6,1 Fälle/Million Einwohner/Jahr im Jahr 2010 (CDC, 2012). In Europa sind dagegen bis heute weniger als 100 Fälle beschrieben (Doudier et al., 2010; Dumler et al., 2005). Dieser extreme Unterschied in beschriebenen Neuerkrankungen zwischen den USA und Europa liegt vermutlich neben der vorhandenen oder fehlenden Meldepflicht und Variablen wie der Verbreitung von *A. phagocytophilum* und dem jeweiligen Vektor, dem natürlich vorkommenden Reservoir und der Wahrscheinlichkeit des Kontaktes zwischen Erreger und Wirt, vor allem an den geographisch unterschiedlich vorkommenden Genvarianten dieses Bakteriums (Woldehiwet, 2010). Auch die dokumentierte Prävalenz von *A. phagocytophilum* in wirtssuchenden *I. ricinus* unterscheidet sich in verschiedenen europäischen Ländern (Tab. 2).

Neben einer Infektion durch Zeckenstich ist eine Übertragung durch Bluttransfusion möglich (Alhumaidan et al., 2013; Annen et al., 2012; Jereb et al., 2012). *A. phagocytophilum* befällt eosinophile und neutrophile Granulozyten und kann letztendlich auch in Monozyten gefunden werden (Woldehiwet and Scott, 1982b; Woldehiwet, 1987). Die zahlreichen genetischen Varianten dieses Bakteriums scheinen sich auch bezüglich ihrer Infektiosität und Pathogenität hinsichtlich verschiedener Wirte zu unterscheiden (de la Fuente et al., 2005a; Foley et al., 2009; Woldehiwet, 2010). Die milden bis schwerwiegenden Symptome bei Erkrankungen des Menschen sind grippeähnlich und können von Unwohlsein, Kopfschmerz und Übelkeit über Erbrechen und Fieber bis hin zu ernsthaften Muskel- und Gelenkschmerzen reichen (Petrovec et al., 1997). Veränderungen des Blutbildes sind in einer Leukozytopenie, verursacht durch Lymphozytopenie, Neutropenie und Thrombozytopenie, erkennbar (Gokce and Woldehiwet, 1999; Woldehiwet, 1987, 2010). Auch Auftreten von Anämie ist möglich (Gokce and Woldehiwet, 1999; Süss et al., 2004). Durch die Zerstörung von Zellen der Immunabwehr kann es folglich zu schwerwiegenden Sekundärerkrankungen z.B. durch *Staphylococcus aureus*-Infektion kommen (Woldehiwet, 2010). In seltenen Fällen können sich auch neurologische Symptome zeigen (Süss et al., 2004). Nachweise von *A. phagocytophilum* sind auch in Katzen

(Heikkilä et al., 2010; Schaarschmidt-Kiener et al., 2009), Hunden (Kohn et al., 2008; Silaghi et al., 2011e), Schafen (Stuen et al., 2002), Ziegen (Silaghi et al., 2011g), Rindern (Nieder et al., 2012) und Pferden (Silaghi et al., 2011f; Von Loewenich et al., 2003) beschrieben.

Die Diagnose kann anhand der Symptome, der genannten Blutbildveränderungen, der im Giemsa gefärbten Blutaussstrich zu sehenden Erreger oder mittels Anzucht aus Patientenmaterial in der Zellkultur gestellt werden. Die sensitivste und schnellste Nachweismethode stellt jedoch die PCR dar (Bakken and Dumler, 2006; Dumler et al., 2007; Süss et al., 2004).

Bei wiederholtem Kontakt mit dem Erreger kann abhängig von der genetischen *A. phagocytophilum*-Variante und der Zeitspanne zwischen Erst- und Zweitinfektion eine vorübergehende Immunität ausgebildet werden, so dass eine erneute Erkrankung nicht zustande kommt bzw. mit wesentlich mildereren klinischen Symptomen in Erscheinung tritt (Foggie, 1951; Woldehiwet and Scott, 1982a; Woldehiwet, 2010).

3.4. *Anaplasma phagocytophilum* in Rehwild

Vergangene Studien in verschiedenen europäischen Ländern ergaben eine Prävalenz von *A. phagocytophilum*-DNA in Rehwild (überwiegend aus Blut- und Milzproben) zwischen 18% in der Schweiz (Liz et al., 2002), 13%-32% in Tschechien (Hulinská et al., 2004; Petrovec et al., 2003; Zeman and Pecha, 2008), 38% im Vereinigten Königreich und Spanien (Alberdi et al., 2000; Oporto et al., 2003), 43% in Dänemark (Skarphédinsson et al., 2005) über ca. 50% in der Slowakei (Stefanidesova et al., 2008), 54%-88% in Polen (Rymaszewska, 2008; Skotarczak et al., 2008), 43%-74% in Österreich (Petrovec et al., 2003; Polin et al., 2004; Silaghi et al., 2011b) bis zu 94.0% in Deutschland (Scharf et al., 2011).

Eine hohe *A. phagocytophilum*-Prävalenz in Rehwild kann vor allem an Standorten mit hoher *I. ricinus*-Dichte gefunden werden (Alberdi et al., 2000). Eine Prädisposition aufgrund des Geschlechts der Tiere ist nicht beschrieben (Polin et al., 2004; Silaghi et al., 2011b; Skarphedinsson et al., 2007; Stefanidesova et al., 2008). Über den Einfluss des Alters eines Individuums auf die *A. phagocytophilum*-Positivität liegen unterschiedliche Beobachtungen vor. So konnte bei Polin et al. (2004) und Skarphedinsson et al. (2007) kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Alter eines Rehes und dem Nachweis von *A. phagocytophilum* gefunden werden. In einer anderen Studie waren dagegen Tiere älter als drei Jahre signifikant geringer positiv für *A. phagocytophilum* als jüngere Tiere (Silaghi et al., 2011b). Beim Vergleich der im Rehwild vorkommenden genetischen Varianten von *A. phagocytophilum* deutet sich eine Differenzierung zu den für den Menschen pathogenen Varianten an (de la Fuente et al., 2005a;

Petrovec et al., 2002; Rymaszewska, 2008; Silaghi et al., 2011b). Humanpathogene Varianten sind allem Anschein nach nur sporadisch im Rehwild zu finden (Rymaszewska, 2008). Über die tatsächliche Pathogenität der Varianten für das Reh selbst, lässt sich aufgrund mangelnder Studien keine Aussage treffen (Alberdi et al., 2000). Die Mehrzahl der Rehe befindet sich aber meist in einem guten Allgemeinzustand und zeigt keine klinischen Symptome (Scharf et al., 2011; Silaghi et al., 2011b).

Tab. 2: *Anaplasma phagocytophilum*-Prävalenz in wirtssuchenden *I. ricinus* in verschiedenen Habitaten und europäischen Ländern ¹⁾

Habitat	Land	Untersuchungszeitraum ²⁾	Prävalenz	Referenz
Parkanlagen	Italien	2006	0%	(Corrain et al., 2012)
Parkanlagen	Italien	2010	0%-14,9% ³⁾	(Aureli et al., 2012)
Parkanlagen	Deutschland	2009-2010	6,6-9,5%	(Schorn et al., 2011a)
Weide	Belgien	2010	3,0%	(Lempereur et al., 2012)
Wald	Frankreich	2006-2007	0,3%	(Cotté et al., 2010)
Wald	Frankreich	2008	0,7% ³⁾	(Reis et al., 2011)
Wald	Westschweiz	2009-2010	1,5%	(Lommano et al., 2012)
Wald	Deutschland	2006-2007	5,4%	(Hildebrandt et al., 2010a)
Wald	Slowakei	kA	8,0%	(Subramanian et al., 2012)
unterschiedlich	Ungarn	2006-2008	0,4% ³⁾	(Egyed et al., 2012)
unterschiedlich	Deutschland	2008	1,0%	(Franke et al., 2011)
unterschiedlich	Luxemburg	2007	1,9%	(Reye et al., 2010)
unterschiedlich	Norwegen	2011	2,3%	(Soleng and Kjelland, 2012)
unterschiedlich	Deutschland	2005	3,2%	(Schicht et al., 2011)
unterschiedlich	Weißrussland	2009	4,2%	(Reye et al., 2013)
unterschiedlich	Polen	2007-2008	8,5% ³⁾	(Sytykiewicz et al., 2012)
unterschiedlich	Deutschland	2009	8,7%	(Silaghi et al., 2012b)
unterschiedlich	Spanien	2005-2006	10,7% ³⁾	(Portillo et al., 2011)

1) Prävalenzen aus Publikationen ab 2010 (nicht erschöpfend),

Prävalenzen aus älteren Publikationen siehe (Poljak, 2012; Silaghi, 2008)

2) kA=keine Angabe

3) gepoolte Proben enthalten

4. *Rickettsia* spp.

4.1. Taxonomie, Morphologie

Rickettsia spp. sind wie *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Neorickettsia*, *Orientia* und *Wolbachia* α -Proteobakterien und in der Ordnung Rickettsiales eingegliedert, in der sie in der Familie Rickettsiaceae zu finden sind. Bis jetzt sind ca. 25 verschiedene Spezies definiert, wovon 16 als pathogen gelten (Fournier and Raoult, 2009; Socolovschi et al., 2009). Aufgrund verschiedener Merkmale fand eine Einteilung in drei Gruppen statt: a) die Zeckenbissfiebergruppe [engl. spotted fever group; >20 verschiedene Spezies (vor allem von Zecken, aber auch Flöhen und Milben übertragbar)] b) die Fleckfiebergruppe [engl. typhus group; *R. prowazekii* und *R. typhi* (übertragen von Läusen und Flöhen)] und c) die sogenannte Gruppe der Ur-Rickettsien (*R. canadensis* und *R. belii*) (Dobler and Wölfel, 2009; Fournier and Raoult, 2009; Süss et al., 2004). Innerhalb der Zeckenbissfiebergruppe ist wiederum eine Einteilung in verschiedene Cluster zu finden, innerhalb welcher *R. helvetica* zur *R. helvetica*-Gruppe und *R. monacensis* zur *R. massiliae*-Gruppe gehört (Fournier and Raoult, 2009).

Rickettsien sind gramnegative, obligat intrazellulär in eukaryotischen Zellen lebende Parasiten von kokkoider Gestalt und einer Größe zwischen 0,3-0,5x1,0-2,0µM (Fournier and Raoult, 2009; Süss et al., 2004).

4.2. Entwicklungszyklus, Reserviertiere

Die Vermehrung im Wirbeltierwirt findet überwiegend im Endothel kleiner Gefäße durch Querteilung im Zytoplasma statt (Süss et al., 2004). Die Infektion der Zecke geschieht zunächst über die Darmzellen durch Aufnahme und Verdauung einer *Rickettsia* spp.-haltigen Blutmahlzeit. Anschließend können die Bakterien aus dem Verdauungssystem in die Körperhöhle, Hämolymphe, Speicheldrüsen und Eierstöcke der Zecke einwandern, sich dort vermehren und zu einer systemischen Infektion führen (Socolovschi et al., 2009).

Aufgrund der möglichen transovariellen und transstadialen Übertragung in Zecken werden diese als hauptsächliches Reservoir für Rickettsien aus der Zeckenbissfiebergruppe angesehen (Socolovschi et al., 2009). So betrug in Untersuchungen von Socolovschi et al. (2009) die transovarielle Übertragungsrate für *R. helvetica* in *I. ricinus* 100%. Bis jetzt konnte unter den Wirbeltieren noch kein eindeutiger Reserviertierwirt für *Rickettsia* spp. gefunden werden, aber Nager und kleine Säugetiere wurden für *R. helvetica* und *R. monacensis* in Betracht gezogen (Burri et al., 2011; Schex et al., 2011). Ebenso wurde die Möglichkeit, dass Vögel als natürliche

Reservoir für *Rickettsia* spp. fungieren könnten diskutiert (Santos-Silva et al., 2006; Stańczak et al., 2009).

4.3. Verbreitung, Klinik

In Deutschland wurden bereits *R. slovaca* (Pluta et al., 2009; Silaghi et al., 2011c), *R. helvetica* (Schorn et al., 2011b; Silaghi et al., 2008b; 2011c), *R. felis* (Dobler and Wölfel, 2009; Richter et al., 2002), *R. monacensis* (Schorn et al., 2011b; Silaghi et al., 2008b; Simser et al., 2002), *R. massiliae* (Dobler and Wölfel, 2009) und *R. raoultii* (Pluta et al., 2009; Silaghi et al., 2011c) in Zecken nachgewiesen. Die in *I. ricinus* überwiegend zu findenden *Rickettsia*-Spezies sind *R. helvetica* und *R. monacensis* (Tab. 3).

Hauptsymptome der Zeckenbissfieber-Rickettsiosen sind neben Fieber auch Kopf- und Muskelschmerzen, Exantheme und Veränderungen an der Einstichstelle („tache noire“) (Parola et al., 2005; Süss et al., 2004). Im Blutbild können Thrombozytopenie, abnorme Leukozytenwerte und erhöhte Leberwerte gemessen werden (Parola and Raoult, 2001). Die Pathogenität von *R. helvetica* für den Menschen ist immer noch nicht vollständig geklärt, jedoch wurde diese Spezies im Zusammenhang mit fieberhafter Erkrankung, Hirnhautentzündung (Nilsson et al., 2010) und plötzlichem Herzversagen erwähnt (Fournier et al., 2000; Nilsson et al., 1999). Auch *R. monacensis* wurde kürzlich als verursachendes Agens einer fieberhaften humanen Erkrankung in Italien genannt (Madeddu et al., 2012).

Aufgrund möglicher Kreuzreaktionen im indirekten Nachweis geschieht der Erregernachweis aus biologischem Material am schnellsten und eindeutigsten durch Einsatz der PCR und anschließender Sequenzierung (Dobler and Wölfel, 2009).

4.4. *Rickettsia* spp. in Rehwild

In den wenigen beschriebenen Studien über die Prävalenz von *Rickettsia* spp. in Rehwild wurde dieses Bakterium nicht oder nur zu sehr geringem Prozentsatz in diesen Tieren (Blut und Milz) gefunden [0% in Dänemark (Skarphédinsson et al., 2005), 0%-3% (*R. helvetica*) in der Slowakei (Smetanová et al., 2006; Stefanidesova et al., 2008)]. Diese niedrige Prävalenz könnte durch eine nicht vorhandene Reservoirkompetenz dieser Tierart für *Rickettsia* spp. oder eine sehr kurze bakteriämische Phase im einzelnen Individuum begründet sein (Smetanová et al., 2006).

Tab. 3: *Rickettsia* spp.-Prävalenz in wirtssuchenden *I. ricinus* in verschiedenen Habitaten und europäischen Ländern ¹⁾

Habitat	Land	Untersuchungs- zeitraum ²⁾	Prävalenz	Gefundene Spezies	Referenz
Parkanlagen	Deutschland	2009-2010	6,4-7,7% ³⁾	95% <i>R. helvetica</i> , 5% <i>R. monacensis</i>	(Schorn et al., 2011b)
Parkanlagen	Italien	2006	15,7%	16,7% <i>R. helvetica</i> , 83,3% <i>R. monacensis</i>	(Corrain et al., 2012)
Wald	Frankreich	2006-2007	1,4%	<i>R. helvetica</i>	(Cotté et al., 2010)
Wald	Frankreich	2008	5,8% ³⁾	<i>R. helvetica</i>	(Reis et al., 2011)
Wald	Westschweiz	2009-2010	10,2%	90,7% <i>R. helvetica</i> , 8% <i>Rickettsia</i> spp., 1,3% <i>R. monacensis</i>	(Lommano et al., 2012)
Wald	Slowakei	kA	11%	<i>R. helvetica</i>	(Subramanian et al., 2012)
Wald	Deutschland	2006-2007	14,7%	45% <i>R. helvetica</i> 19% <i>R. monacensis</i> 36% <i>Rickettsia</i> spp.	(Hildebrandt et al., 2010a)
unter- schiedlich	Ungarn	2006-2008	1,9% ³⁾	94,7% <i>R. helvetica</i> 5,3% <i>R. monacensis</i>	(Egyed et al., 2012)
unter- schiedlich	Luxemburg	2007	5,1%	98,6% <i>R. helvetica</i> , 1,4% <i>R. monacensis</i>	(Reye et al., 2010)
unter- schiedlich	Deutschland	2008	8,5%	32% <i>R. helvetica</i> , 16% <i>R. monacensis</i> , 52% <i>Rickettsia</i> spp.	(Franke et al., 2011)
unter- schiedlich	Serbien	2007, 2009	23,1% ³⁾	33,3% <i>R. helvetica</i> , 66,6% <i>R. monacensis</i>	(Radulović et al., 2011)
unter- schiedlich	Weißrussland	2009	11,8%	85,3% <i>R. helvetica</i> , 14,7% <i>R. monacensis</i>	(Reye et al., 2013)
unter- schiedlich	Deutschland	2008-2009	13,4-17,4% ³⁾	<i>R. helvetica</i>	(Silaghi et al., 2011c)
unter- schiedlich	Deutschland	2005	33,3%	98,9% <i>R. helvetica</i> , 1,1% <i>R. monacensis</i>	(Schicht et al., 2012)

1) Prävalenzen aus Publikationen ab 2010 (nicht erschöpfend),

Prävalenzen aus älteren Publikationen siehe (Poljak, 2012; Silaghi, 2008)

2) kA=keine Angabe

3) Proben teilweise gepoolt

5. *Bartonella* spp.

5.1. Taxonomie, Morphologie

Bartonella spp. ist wie *A. phagocytophilum* und *Rickettsia* spp. in der Klasse der α -Proteobakterien zu finden, in der es in der Ordnung der Rhizobiales zur Familie der Bartonellaceae und Gattung *Bartonella* gehört (Rolle and Mayr, 2006). Bartonellen sind gram- und Oxidase-negative, aerob wachsende Stäbchenbakterien mit fakultativ intrazellulärer Lebensweise (Anderson and Neuman, 1997; Brenner et al., 1993). Bis heute sind 24 Spezies dieser Gattung beschrieben, wovon 13 als potentiell humanpathogen gelten (Vayssier-Taussat et al., 2009).

5.2. Reservoirtiere, Verbreitung

Die Übertragung von *Bartonella* spp. erfolgt durch blutsaugende Arthropoden, die neben der Vektor- höchstwahrscheinlich auch Reservoirfunktion besitzen (Birtles, 2005). Verschiedene Vektoren und Säugetierreservoirs sind für *Bartonella* spp. beschrieben, wie z.B. Lausfliegen (Fam. Hippoboscidae) für *Bartonella schoenbuchensis* und *Bartonella chomelii* in Wiederkäuern (Dehio et al., 2004; Halos et al., 2004), Flöhe für *Bartonella grahamii* bzw. *Bartonella taylorii* in Rötelmäusen und *Bartonella henselae* in Katzen (Bown et al., 2004; Chomel et al., 1996; Eisen and Gage, 2012) und Läuse und Sandfliegen für die Übertragung von *Bartonella quintana* bzw. *Bartonella bacilliformis* zwischen Menschen (Birtles, 2005; Brouqui et al., 2005; Ihler, 1996). Der Kontakt zwischen verletzter Haut eines potentiellen Wirtes und *Bartonella* spp.-haltigem Kot des Vektors stellt eine weitere Übertragungsmöglichkeit dar. Die genetisch vielfältigen *Bartonella*-Spezies besitzen meist hohe Spezifität zu einzelnen Säugetieren oder deren nah verwandten Arten (Chomel et al., 2009). Die Infektion im Reservoirwirt verläuft meist asymptomatisch. Im Gegensatz dazu können verschiedene *Bartonella* spp. in anderen Wirten, so z.B. dem Menschen Erkrankungen hervorrufen (Dehio and Sander, 1999). Dies ist vermutlich durch Infektion unterschiedlicher Zielzellen verursacht, da im „Nicht-Reservoirwirt“ meist Endothelzellen und nicht wie im Reservoirwirt Erythrozyten befallen werden (Chomel et al., 2009; Dehio, 2005; Schüle et al., 2001). *Bartonella* spp. in wirtssuchenden *I. ricinus* konnte bereits in verschiedenen Studien nachgewiesen werden. Die Prävalenz reicht von 0,3% (*Bartonella henselae*) in Luxemburg (Reye et al., 2010), 0,2% (*Bartonella* sp.) in West-Frankreich (Cotté et al., 2010), über 1,2% (*Bartonella* spp.) in Tschechien (Hercik et al., 2007), 4,8% in Deutschland (*B. henselae*, *B. grahamii*) (Janecek et al., 2012) bis zu 9,8% (*Bartonella schoenbuchensis*-like) in Nord-Frankreich (Halos et al., 2005). Die Rolle der Zecken im

Allgemeinen und von *I. ricinus* im Speziellen als Überträger bestimmter *Bartonella*-Spezies ist vielfach diskutiert, aber nicht bewiesen (Mosbacher et al., 2010; Telford and Wormser, 2010).

5.3. *Bartonella* spp. in Rehwild

Bartonella spp. wurden bereits in domestizierten und wildlebenden Wiederkäuern gefunden, welche als potentiell natürliches Reservoir für diese in Frage kommen (Bermond et al., 2002; Chang et al., 2000; Dehio et al., 2001). Studien, die die Prävalenz von *Bartonella* spp. in Rehwild in verschiedenen Ländern erforschen, sind bis jetzt kaum durchgeführt. Eine Prävalenz von 42,7% in Blut- und Milzproben von Rehwild konnte in Polen ermittelt werden (Skotarczak et al., 2008). In den Niederlanden waren 60% der von Rehen abgesammelten *I. ricinus* positiv auf DNA von *Bartonella* spp. (Schouls et al., 1999).

In Rehwild wurde *Bartonella capreoli*, *Bartonella schönbuchensis* und *Bartonella bovis* nachgewiesen (Bermond et al., 2002; Dehio et al., 2001; Skotarczak and Adamska, 2005).

III. MATERIAL UND METHODEN

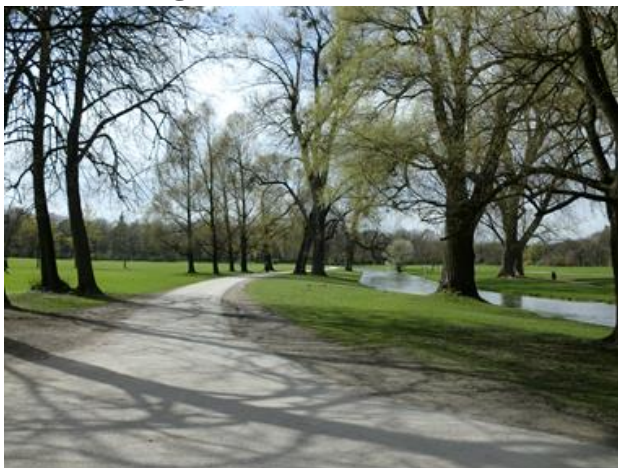
1. Standortauswahl

In der vorliegenden Arbeit wurden sechs Standorte aus drei verschiedenen Habitaten (Parkanlagen, Weide und Wald) in den Jahren 2011 und 2012 untersucht (Abb. 3-8). Die Standortauswahl erfolgte nach projektspezifischen Kriterien (EDENext <http://www.edenext.eu/>). Die Parkanlagen und die Weide sollten Kontakt zwischen Haus bzw. Nutz- und Wildtieren aufweisen, wohingegen im Waldgebiet dieser Kontakt möglichst ausgeschlossen sein sollte. Da in näherer Umgebung zu München kein völlig „naturbelassener“ Wald-Standort vorhanden war, wurde ein Forstgebiet mit geringer bis nahezu nicht vorhandener Interaktion zwischen Haus- und Wildtieren ausgewählt. Vier der gewählten Standorte waren Parkanlagen in München (M2, M3), Regensburg (R1) und Nähe Starnberg am Starnberger See (B). Diese Parkanlagen wurden in einer vorangegangenen Studie in den Jahren 2009/2010 bereits untersucht (Poljak, 2012) und zur Ermittlung longitudinaler Daten weiter beprobt. Als Weidehabitat wurden zwei Weiden auf Gut Kerschlach (zwischen Starnberger See und Ammersee gelegen) und als Wald der Angelberger Forst südlich von Augsburg ausgewählt. Die geographische Lage der Standorte ist in einer Übersichtskarte in Publikation 1 dargestellt (Seite 48).

1.1. Stadtgebiet München

Im Stadtgebiet München wurden zwei Parkanlagen in dieser Studie untersucht. Der Englische Garten (Punkt 1.1.1) und der Nymphenburger Schlosspark (Punkt 1.1.2.). Das am häufigsten vorkommende Säugetier im Stadtgebiet München ist die Waldmaus, in Wald- und Parkanlagen sind Rötelmäuse, seltener Gelbhalsmäuse zu finden. Die Waldspitzmaus ist neben weiteren Kleinsäugetern ebenfalls weit verbreitet (Bayerisches Landesamt für Umwelt, 2004)

1.1.1. Englischer Garten, M2



48°09'01.73"N, 11°35'24.19"E

Abb. 3: Englischer Garten

Der Englische Garten ist eine 375ha große Parkanlage im Zentrum Münchens, welche seit 1966 durch den mittleren Ring (Isarring) in einen Nord- und Südteil geteilt ist. Die Zeckensammlung erfolgte im Südteil des

Parks. Die großzügig angelegten, kurz gemähten Rasenflächen werden vor allem im Sommer intensiv von Besuchern und deren zahlreichen freilaufenden Hunden genutzt. Da in diesem Teil des Englischen Gartens keine größeren Wildtiere wie Rehe und Wildschweine vorkommen, ist der Kontakt zwischen Haus- und Wildtieren auf Wildtiere wie Mäuse, Igel, Füchse, Vögel usw. beschränkt.

1.1.2. Nymphenburger Schlosspark, M3



48°09'38.93"N, 11°29'33.31"E

Abb. 4: Nymphenburger Schlosspark

Der Nymphenburger Schlosspark ist im Westen der Stadt München gelegen und im Gegensatz zum Englischen Garten ausgewiesenes Landschaftsschutzgebiet (FFH Gebietnr. 7834-301) mit artenreicher Flora und Fauna. Die 141 ha große Fläche des Parks ist von einer Mauer umgeben, innerhalb welcher abwechslungsreiche, waldähnliche Strukturen eine Vielzahl an Wildtieren,

u.a. auch eine Rehpopulation beherbergen. Die Grasflächen im Park werden flächenmäßig extensiv genutzt und ein Großteil der Wiesen wird nur ein- bis zweimal pro Jahr gemäht (Seitz et al., 2012). Die Besucher sind angewiesen die Wege nicht zu verlassen und Hunde an der Leine zu führen.

1.2. Dörnbergpark, R1 (Regensburg)



49°00'55.72"N, 12°05'08.89"E

Abb. 5: Dörnbergpark

Mit seinen 7,4ha ist dieser im Zentrum von Regensburg gelegene und von einer Mauer umgebene Park der flächenmäßig kleinste der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Standorte. Die zahlreichen Besucher und ihre angeleiteten Hunde dürfen sich

auch abseits der Wege auf den gemähten Wiesen bewegen. Besonders erwähnenswerte Wildtiervorkommen gibt es, bis auf die große Vielfalt an Vögeln, von welchen 20 Arten ihre dauerhafte Brutstätte im Dörnbergpark haben nicht (Stadt Regensburg Umweltreferat-Gartenamt, 1996).

1.3. Schlosspark Berg, B (Berg, Starnberg)



47°57'43.85"N, 11°20'53.35"E

Abb. 6: Schlosspark Berg

Der Schlosspark in Berg besteht aus einem 18ha großen öffentlich zugänglichen und einem ca. 12ha umfassenden privaten Teil. Auf der Ostseite des Starnberger Sees gelegen wird dieser waldähnliche Park täglich von zahlreichen Besuchern zu Fuß oder auf dem Fahrrad durchquert. Das Mitführen von angeleinten Hunden ist gestattet. Der Park bietet Lebensraum für

verschiedene Wildtiere, worunter auch Rehe zu finden sind. Über das Vorkommen anderer Säugetiere, besonders von Kleinsäugetern im Landkreis Starnberg bestehen Wissenslücken (Bayerisches Landesamt für Umwelt, 2007).

1.4. Kerschlach, K (Pähl, Weilheim/Schongau)



47°54'57.18"N, 11°12'44.04"E

Abb. 7: Kerschlach

Zwei ca. 8ha große Rinderweiden, die von einem Elektrozaun umgeben sind, wurden als Weidehabitat ausgewählt. Die Sammlung der wirtssuchenden Zecken wurde auf der Grasfläche innerhalb des umzäunten Areals vorgenommen.

Zahlreiche Waldflächen umgeben das Gut und die Weiden, wodurch der Kontakt zwischen Wildtieren, z.B. Rehen und den Rindern gegeben ist.

1.5. Angelberger Forst, T (Tussenhausen, Unterallgäu)



48°06'36.42"N, 10°34'33.40"E

Abb. 8: Angelberger Forst

Das 641ha große Waldgebiet, welches wie der Nymphenburger Schlosspark ein Schutzgebiet darstellt (FFH Gebietsnr. 7829-301) beherbergt zahlreiche Wildtiere. Darunter finden sich mehr als 100 verschiedene Vogelarten (Bezzel et al., 2005) und Säugetiere wie Rehwild, Wildschweine, Dachse (*Meles meles*),

Füchse, Hasen, Igel und verschiedene Mäusearten. Da nur wenige Besucher das Waldgebiet für Spaziergänge nutzen, ist der Kontakt zwischen Haus- und Wildtieren begrenzt.

2. Probensammlung

2.1. Wirtssuchende Zecken

In April, Mai und Juni 2011 und 2012 wurden wirtssuchende Zecken 1x pro Monat an jedem Standort mit der „Flagg-Methode“ von der Vegetation gesammelt. Zur Messung der jeweilig vorhandenen Zeckendichte wurde eine 300m² große Fläche beprobt, welche in drei Abschnitte von je 100m² unterteilt wurde. Die Sammlung wurde auf jedem Abschnitt mit einem 1m² großen, weißen Baumwolltuch, befestigt an einem Holzstab („Flagge“) vorgenommen, welches dicht über die Vegetation gezogen wurde. Nach jeweils fünf Schritten von ca. 50cm Länge wurde die Flagge umgedreht und alle darauf vorhandenen Zecken mit einer Pinzette abgesammelt. Dieser Vorgang wurde 40x wiederholt, wodurch eine Gesamtfläche von insgesamt 100m² beprobt wurde. Die Absammlung eventuell auf der Flagge vorhandener Larven erfolgte am Ende jedes 100m²- Abschnittes. Die beabsichtigte Mindestanzahl an gesammelten Zecken betrug 40 Zecken pro Geschlecht und Stadium (ausschließlich Larven) pro Monat und Jahr. Bei Nichterreichung der gewünschten Anzahl an Zecken auf der Fläche von 300m² erfolgte eine weitere Sammlung zusätzlicher „Auffüll-Zecken“ von der Vegetation nahe der zuvor beprobten Fläche. Alle Zecken eines Abschnittes wurden vor Ort in ein mit 70% Alkohol gefülltes 15mL Röhrchen (nerbe plus, Winsen/Luhe, Germany) gegeben und anschließend bei Raumtemperatur gelagert.

2.2. Probenmaterial von Rehwild

Die Sammlung der Rehwildproben wurde von September 2010 bis Januar 2012 durchgeführt. Alle Rehe, außer ein durch einen Verkehrsunfall verendetes, wurden waidmännisch gejagt.

2.2.1. Gesaugte Zecken

Ab Mai 2011 wurden Zecken von jedem Reh abgesammelt. Der Jäger entfernte maximal 20 Zecken von jedem Individuum auch wenn auf diesem mehr Zecken vorhanden waren.

2.2.2. Blut-, Milz- und Hautproben

Blut-, Milz und Hautproben wurden direkt nach Abschuss entnommen. Hautproben wurden erst ab Mai 2011 gesammelt. Blutproben wurden aus den Venae illiacae communes in EDTA Röhrchen BD Vacutainer® [K2E, 3mL (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Germany)] abgenommen. Milz- und Hautproben (Ohr) wurden einzeln mit einer sterilen Stanze [6mm KRUUSE Biopsy Punch (Henry Schein Vet, Hamburg, Germany)] gesammelt. Ab Januar 2011 wurde den EDTA Röhrchen vor der Blutabnahme im Labor 30µL Penicillin/Streptomycin (10.000U/ml and 10.000µg/ml) und 30µL Amphotericin B (250µg/ml) (Biochrom, Berlin, Germany) zugesetzt, da positive Blutproben von natürlich infizierten Rehen zusätzlich zur Anzucht von *A. phagocytophilum* in IDE8 Zecken-Zellkultur verwendet wurden (Zweygarth et al. unveröffentlichte Daten).

3. Laborarbeiten

3.1. Zeckenbestimmung

Alle Zecken (wirtssuchend und gesaugt) wurden im Labor mit Aq. dest. in zwei verschiedenen Petrischalen in Folge gewaschen, auf Zellstoffpapier getrocknet und Nymphen und Adulte anschließend in 2mL Röhrchen (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) einzeln und Larven in Pools von maximal 5 Zecken separiert. Die morphologische Bestimmung der Zecken erfolgte mit Hilfe einer Stereolupe nach Art, Entwicklungszustand und Geschlecht (Hillyard, 1996). Die Zecken wurden bis zur weiteren Untersuchung bei -20°C eingefroren.

3.2. Nummerierung und tabellarische Erfassung des Probenmaterials

Alle Proben wurden nach einheitlichem Schema beschriftet und tabellarisch erfasst.

3.2.1. Wirtssuchende Zecken

Folgendes Beschriftungs-Schema wurde für wirtssuchende Zecken angewandt: Jahr (nur für 2012), Monat, Standort, Streckenabschnitt (Transect I-III und A=Auffüller), Zeckennummer (beginnend bei 1 fortlaufend je vorgenommener Sammlung pro Standort/Monat/Jahr).

Folgende Kürzel wurden verwendet: EG=Englischer Garten, N=Nymphenburg, D=Dörnbergpark, B=Berg, K=Kerschlach und T=Tussenhausen.

Beispiel: 4NIII13 (Jahr 2011, Monat April, Standort Nymphenburg, Transect II, Zecke 13) oder 125DI1 (Jahr 2012, Monat Mai, Standort Dörnbergpark, Transect I, Zecke 1).

3.2.2. Probenmaterial von Rehwild

Folgendes Beschriftungs-Schema wurde für Rehwildproben angewandt: Standort (Tussenhausen), Tierart (Reh), Tiernummer, Material (Zecken gesaugt, Blut, Milz, Haut) gegebenenfalls Zeckennummer (1-20).

Folgende Kürzel wurden verwendet: T=Tussenhausen, R=Reh, B=Blut, M=Milz, H=Haut, Z=Zecke.

Beispiel: TR61Z1 (Standort Tussenhausen, Tierart Reh, Rehnummer 61, untersuchtes Material Zecke, Zeckennummer 1) oder TR95M (Standort Tussenhausen, Tierart Reh, Rehnummer 95, untersuchtes Material Milz).

3.3. DNA Isolierung

Die Isolierung der DNA erfolgte automatisch mit dem Maxwell[®] 16 System und dem dazugehörigen Maxwell[®] 16 LEV Blood DNA Extraktionskit (Promega, Mannheim, Deutschland) aus einem Maximum von 60 wirtssuchenden Zecken pro Entwicklungsstadium, Geschlecht, Monat und Jahr (Nymphen und Adulte einzeln, Larven in Pools von 1-5 Zecken), einem Maximum von 5 weiblichen und 5 männlichen gesaugten Zecken/Reh und aus allen vorhandenen Gewebe- (95x Milz und 56x Haut) und 86 Blutproben.

Die DNA aus allen Blutproben ab dem Jahr 2011 wurde zur Minimierung des Kontaminationsrisikos und zur Qualitätssicherung der Probenbearbeitung und der Pathogendetektion direkt nach Eintreffen im Labor isoliert.

Die DNA-Isolierung aus den Blutproben wurde nach den Herstellerangaben durchgeführt. Gewebe- (Teilproben aus Milz und Haut von der Größe eines Reiskorns) und Zeckenproben (Teilung weiblicher gesaugter Zecken längs mit sterilen Skalpell) wurden unterschiedlich weiter aufbereitet.

Zunächst wurden alle Zecken unter Verwendung von 300µL PBS Lösung und einer 5mm großen Stahlkugel im Tissue Lyser (Qiagen, Hilden, Germany) mit einer Geschwindigkeit von 20 Schlägen/Sekunde über einen Zeitraum von 5 Minuten zerkleinert. Im Anschluss wurde mit Gewebe- und Zeckenproben auf die gleiche Weise verfahren: 300µL Lysis Buffer und 30µL Proteinase K wurden den Proben zupipettiert und diese bei 56°C und einer Geschwindigkeit von 500rpm über Nacht im Thermomixer® comfort (Eppendorf) inkubiert. Alle Proben (inklusive Blut) wurden mit 60µL Elution Buffer eluiert. Anschließend erfolgte zur Erfolgskontrolle eine spektrophotometrische quantitative und qualitative Messung der DNA Konzentration aller Proben (Nano Drop® ND-1000, PeqLab Erlangen, Germany). Vor Durchführung der PCR wurden alle Proben abhängig von der gemessenen DNA-Konzentration in Verdünnungsstufen von 1:1 (unverdünnt) bis 1:100 verdünnt, um ein falsch negatives Ergebnis bedingt durch Einsatz einer zu hoch konzentrierten DNA zu vermeiden (Tab. 4). Zur Ermittlung der am besten geeigneten Verdünnung, wurden einzelne Proben zu Beginn der Arbeit in unterschiedlichen Verdünnungsstufen (1:4, 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10 000) in die PCR eingesetzt.

Tab. 4: angewandte DNA-Extrakt-Verdünnungsschemata [Zecken wirtssuchend, Proben von Rehwild (Zecken gesaugt und Blut-, Milz- und Hautproben)]

Material	gemessene DNA-Konzentrationen vor Verdünnung		Verdünnung ab DNA-Konzentration (in ng/µL)	Verdünnungsstufen	DNA konzentriert + Elution Buffer (in µL)	Aliquots	Berechnete Endkonzentrationen nach Verdünnung	
	Minimal	Maximal					Minimal	Maximal
Zecken wirtssuchend	7,04	245,43	>10	1:4	20+60	2x40µL	2,51	61,36
Zecken gesaugt	14,33	97,29	>10	1:4	20+60	2x40µL	3,58	24,32
	132,79	993,93	>100	1:10	10+90	2x50µL	13,28	99,39
	100,82	1885,17	>1000	1:20	4+76	2x40µL	50,09	94,26
	2009,79	3185,53	>2000	1:100	1+99	2x50µL	20,10	31,86
Blut	42,04	1263,50	alle	1:20	4+76	2x40µL	2,10	63,18
Milz*	26,91	4619,82	alle	1:20	4+76	2x40µL	13,46	230,99
Haut	47,93	381,14	alle	1:10	10+90	2x50µL	4,79	38,11

* eine Probe eingetrocknet, minimale DNA-Konzentration gemessen, Verdünnung 1:2

3.4. Polymerase Kettenreaktion

Alle DNA-Proben wurden molekularbiologisch mittels PCR auf das Vorkommen verschiedener Pathogene untersucht (Tab. 5, 6). Hierfür wurden spezie- bzw. gattungsspezifische Primer verwendet und eine Positiv- und Negativkontrolle in jedem PCR-Lauf eingesetzt. Der PCR-Nachweis für das *A. phagocytophilum* *msp2*-Gen erfolgte mittels Real-Time PCR. Die Untersuchung der Zeckenproben wurde im AB 7500 Real-Time PCR-System (Applied Biosystems®) durchgeführt, die Untersuchung der Gewebeproben dagegen im AB-7500 **FAST** Real-Time PCR-System (Applied Biosystems®) (Courtney et al., 2004; Schorn et al., 2011a; Silaghi et al., 2011b).

Die restlichen Polymerase-Kettenreaktionen wurden in einem konventionellem PCR-Gerät [Thermocycler Mastercycler® gradient (Eppendorf)] durchgeführt.

Folgende Positivkontrollen wurden verwendet: *Babesia* spp.: DNA aus EDTA-Blut von natürlich mit *B. divergens* infizierten Rindern; *A. phagocytophilum*: *in vitro* kultiviertes *A. phagocytophilum* Isolat aus IDE-8 Zeckenzellen; *Rickettsia* spp.: DNA von natürlich mit *R. helvetica* infizierten Zecken aus früheren Studien; *Bartonella* spp.: „Full genome“ Klon von *Bartonella henselae* (American Type Culture Collection 49882D USA).

Tab. 5: Übersicht der auf *Babesia* spp., *A. phagocytophilum*, *Rickettsia* spp. und *Bartonella* spp. untersuchten Proben

DNA		Anzahl (n)	PCR ¹⁾			
			<i>Babesia</i> spp.	<i>A.</i> <i>phagocytophilum</i>	<i>Rickettsia</i> spp.	<i>Bartonella</i> spp.
Zecken wirtssuchend ²⁾	2011	2.186	+	+	+	nu
	2012	2.195	+	+	nu	nu
Zecken gesaugt		331	+	+	+	nu
Blut		86	+	+	nu	nu
Milz		95	+	+	+	+
Haut		56	nu	+	+	+

1) + =untersucht; nu =nicht untersucht

2) keine Untersuchung der Larven (2011 n=233; 2012 n=84) auf *A. phagocytophilum* (da keine transovariable Übertragung)

Tab. 6/1. Teil: PCR-Bedingungen und verwendete Primer

Erreger	Zielgen [Amplikon- länge (bp)]	Primer- und Sondensequenz	PCR- Bedingungen	Reaktionsansatz	Volumen in µL	Referenzen
<i>Babesia</i> spp	<i>18S rRNA</i> (411-452)	B11 5'-GTC TTG TAA TTG GAA TGA TGG-3' BN2 5'-TAG TTT ATG GTT AGG ACT ACG-3'	1) 94°C, 30sek 54°C, 30sek 72°C, 40sek → 40x 2)	total 5) DNA B11 100µM BN2 100µM Buffer 10x dNTPs 10mM HotStarTaqPlus Polymerase 5U/µL H ₂ O (molekularbiologisch rein)	50,0 5,0 0,5 0,5 5,0 1,0 0,25 37,75	(Casati et al., 2006; Schorn et al., 2011b)
				total MMX 2x 3) DNA ApMsp2f 10µM ApMsp2r 10µM ApMsp2p 10µM H ₂ O (molekularbiologisch rein)	20,0 10,0 5,0 1,8 1,8 0,4 1,0	
<i>A. phagocyto- philum</i>	<i>mip2</i> (77)	ApMsp2f 5'-ATG GAA GGT AGT GTT GGT TAT GGT ATT-3' ApMsp2r 5'-TTG GTC TTG AAG CGC TCG TA-3' ApMsp2p 5'-TGG TGC CAG GGT TGA GCT TGA GAT TG-3' am 5'-Ende FAM (Carboxy-Fluorescein) und am 3'-Ende TAMRA (Carboxyl-Tetramethyl-Rhodamine) markiert	50°C, 1sek 95°C, 10min 95°C, 15sek 60°C, 1min → 40x 95°C, 15sek 60°C, 1min. 95°C, 30sek 60°C, 15sek	total MMX 2x 4) DNA ApMsp2f 10µM ApMsp2r 10µM H ₂ O (molekularbiologisch rein)	50,0 25,0 5,0 1,5 1,5 17,0	Courtney et al., 2004; Schorn et al., 2011a; Silaghi et al., 2011b)
				total 5) 1. Amplifikation DNA ge3a 100µM ge10r 100µM H ₂ O (molekularbiologisch rein) 2. Amplifikation PCR-Produkt (Amplifikation 1) ge9f 100µM ge2 100µM H ₂ O (molekularbiologisch rein) Buffer 10x MgCl ₂ 25mM dNTPs 10mM HotStar TaqPlus Polymerase 5U/µL	50,0 5,0 0,5 0,5 36,5 1,0 0,5 0,5 40,5 5,0 1,0 1,0 0,5	
<i>A. phagocyto- philum</i>	<i>16S rRNA</i> (497)	1. Amplifikation: ge3a 5'-CAC ATG CAA GTC GAA CGG ATT ATT C-3' ge10r 5'-TTC CGT TAA GAA GGA TCT AAT CTC C-3' 2. Amplifikation: ge9f 5'-AAC GGA TTA TTC ATA GCT TGC T-3' ge2 5'-GGC AGT ATT AAA AGC AGC TCC AGG-3'	1) 94°C, 30sek 55°C, 30sek 72°C, 1min 1. Amplifikation → 40x 2. Amplifikation → 25x 2)	total 5) 1. Amplifikation DNA ge3a 100µM ge10r 100µM H ₂ O (molekularbiologisch rein) 2. Amplifikation PCR-Produkt (Amplifikation 1) ge9f 100µM ge2 100µM H ₂ O (molekularbiologisch rein) Buffer 10x MgCl ₂ 25mM dNTPs 10mM HotStar TaqPlus Polymerase 5U/µL	50,0 5,0 0,5 0,5 36,5 1,0 0,5 0,5 40,5 5,0 1,0 1,0 0,5	(Massung et al., 1998; Silaghi et al., 2011g)
				total 5) 1. Amplifikation DNA ge3a 100µM ge10r 100µM H ₂ O (molekularbiologisch rein) 2. Amplifikation PCR-Produkt (Amplifikation 1) ge9f 100µM ge2 100µM H ₂ O (molekularbiologisch rein) Buffer 10x MgCl ₂ 25mM dNTPs 10mM HotStar TaqPlus Polymerase 5U/µL	50,0 5,0 0,5 0,5 36,5 1,0 0,5 0,5 40,5 5,0 1,0 1,0 0,5	

Tab. 6/2. Teil: PCR-Bedingungen und verwendete Primer

Erreger	Zielgen [Amplikon- länge (bp)]	Primer- und Sondensequenz	PCR- Bedingungen	Reaktionsansatz	Volumen in µL	Referenzen
<i>gltA</i> Citrat-Synthase Gen (381)		RpCs877p 5'-GGG GGC CTG CTC ACG GCG G-3' RpCs1258n 5'-ATT GCA AAA AGT ACA GTG AAC A-3'	94°C, 3min	total ⁶⁾ DNA	50,0	(Bertolotti et al., 2006; Regnery et al., 1991; Schorn et al., 2011b; Silaghi et al., 2008b)
			95°C, 20sek 48°C, 30sek 60°C, 2min → 35x	RpCs877p 100µM RpCs1258n 100µM Buffer 5x MgCl2 25mM dNTPs 10mM Expand High Fidelity ^{plus} TaqPolymerase 5U/µL H ₂ O (molekularbiologisch rein)	5,0 0,25 0,25 10,0 3,0 1,0 0,5 30,0	
<i>Rickettsia</i> spp.			72°C, 7min			
<i>omp B</i> (765)		120-2788 5'-AAA CAA TAA TCA AGG TAC TGT-3' 120-3599 5'-TAC TTC CGG TTA CAG CAA AGT-3'	94°C, 3min	total ⁶⁾ DNA	50,0	(Roux and Raoult, 2000)
			95°C, 30sek	120-2788 100µM	5,0	
			50°C, 30sek	120-3599 100µM	0,25	
			68°C, 90sek → 40x	Buffer 5x MgCl2 25mM dNTPs 10mM Expand High Fidelity ^{plus} TaqPolymerase 5U/µL H ₂ O (molekularbiologisch rein)	10,0 3,0 1,0 0,5 30,0	
			72°C, 7min			
<i>Bartonella</i> spp.	ITS -Region des <i>I6S-23S</i> <i>rRNA</i> -Gens von <i>Bartonella</i> <i>henselae</i> (635)	Ba325s 5'-CTT CAG ATG ATG ATC CCA AGC CTT CTG GCG-3' Ba1100as 5'-GAA CCG ACG ACC CCC TGC TTG CAA AGC A-3'	1) 94°C, 30sek	total ⁵⁾ DNA	50,0	(Maggi et al., 2006; Schorn et al., 2011b)
			66°C, 30sek	BA325s 100µM	5,0	
			72°C, 50sek → 40x	Ba1100as 100µM Buffer 10x dNTPs 10mM HotStar TaqPlus Polymerase 5U/µL H ₂ O (molekularbiologisch rein)	0,5 0,5 5,0 1,0 0,25 37,75	
			2)			

1) Initiale Aktivierung: 95°C 5min (Qiagen, Hilden, Deutschland)

2) Finale Elongation: 72°C 5min (Qiagen, Hilden, Deutschland)

3) Taq Man[®] fast Universal PCR Mastermix 2x, inkl. Hot Star DNA Polymerase (Applied Biosystems[®], Darmstadt, Deutschland)4) SYBR[®] Green PCR Master Mix 2x, inkl. AmpliTaq Gold[®] DNA Polymerase (Applied Biosystems[®], Darmstadt, Deutschland)

5) HotStarTaqPlus DNA Polymerase Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland)

6) Expand High Fidelity^{PLUS} PCR System (Roche, Mannheim, Deutschland)

3.5. Detektion

Die PCR-Produkte der konventionell durchgeführten PCRs wurden mittels Gel-Elektrophorese auf einem 2%igem Agarosegel (Top Vision Agarose; Fermentas, St.Leon-Rot, Germany) ausgewertet. Jedes Agarosegel wurde mit Gel Red [Gel RedTM Nucleid Acid stain, 10,000x in Wasser (Biotium Hayward, USA), Endkonzentration 1x] versetzt. Zum Größenvergleich der detektierten Genfragmente mit der Genfragmentgröße der Positivkontrolle wurde in jeder Reihe der Geltaschen ein standardisierter DNA Ladder (GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder, Fermentas) eingesetzt. Die Darstellung und Auswertung der Genfragmente erfolgte mittels Bestrahlung mit UV-Licht in einem Geldokumentationssystem (PeqLab). Das PCR-Ergebnis der konventionellen PCRs wurde als positiv angesehen, wenn unter UV-Licht eine Bande auf Höhe der jeweilig eingesetzten Positivkontrolle zu erkennen war.

Das PCR-Ergebnis der Zeckenproben auf *A. phagocytophilum* im AB 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems®) wurde als positiv angesehen, wenn der Ct-Wert <39.0 und das Fluoreszenzmaximum der Schmelzkurvenanalyse zwischen 76.0 und 79.2°C lag.

Das PCR-Ergebnis der Gewebeproben auf *A. phagocytophilum* im AB-7500 **FAST** Real-Time PCR System (Applied Biosystems®) wurde als positiv angesehen, wenn ein Ct-Wert <39.0 erreicht wurde.

3.6. DNA Aufreinigung

PCR-Produkte der jeweiligen Erreger wurde unter Verwendung des QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben aufgereinigt und anschließend die Menge an vorhandener DNA mittels quantitativer und qualitativer Messung (Nano Drop® ND-1000, PeqLab) ermittelt.

3.7. Sequenzierung

Die Sequenzierung wurde von Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Germany) durchgeführt. Vor dem Versand der aufgereinigten Proben wurden diese entsprechend der Fragmentlänge des enthaltenen Genabschnittes auf die von Eurofins geforderte Konzentration von 5ng/μL mit molekularbiologisch reinem Wasser verdünnt. Proben mit DNA von *A. phagocytophilum* wurden mit beiden Primern des zweiten Amplifikationsschrittes der *16S rRNA* sequenziert, Proben mit DNA von *Babesia* spp., *Rickettsia* spp. und *Bartonella* spp. dagegen mit jeweils einem der beiden Primer. Die Ergebnisse der Sequenzierung wurden mit dem Programm Chromas Lite[®] ausgewertet. Die Rückwärtssequenzen von *A. phagocytophilum* wurden mit Reverse Complement (http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html) umgedreht und komplementiert und der Abgleich mit der Vorwärtssequenz mit ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) vorgenommen. Die Suche vergleichbarer Sequenzen in der GenBank wurde mit dem Programm BLAST, welches vom „National Center for Biotechnology Information“ (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) bereitgestellt wird durchgeführt. Alle *A. phagocytophilum* Sequenzen wurden mit Sequenzen aus früheren Studien verglichen (Schorn et al., 2011a; Silaghi et al., 2008a; 2011a; b). Proben, bei denen das Sequenzierungsergebnis des *18S rRNA* Genstückes von *Babesia* spp. keine 100% Zuordnung zu *B. divergens* oder *B. capreoli* durch Vergleich mit Sequenzen aus der GenBank ermöglichte, wurden mit dem kompletten Genom der *18S rRNA* von *B. capreoli* bzw. *B. divergens* an den Genpositionen 631 und 663 verglichen. Diese Positionen stellen zwei der drei vorhandenen Nukleotidunterschiede dieses Genabschnittes dar und gelten als spezifisch für die jeweilige Babesien-Spezies. Dadurch war eine genaue Zuordnung zu *B. capreoli* bzw. *B. divergens* in der vorliegenden Arbeit möglich (Malandrin et al., 2010; Silaghi et al., 2011a).

3.8. Statistik

Die Statistik wurde in Kooperation mit dem Stablab (Institut für Statistik der Ludwig-Maximilians-Universität München) erstellt.

Die exakten Konfidenzintervalle (CI 95%) der Prävalenzen in wirtssuchenden Zecken wurden mit der Clopper und Pearson Methode berechnet (Clopper and Pearson, 1934). Zwei logistische Regressionsmodelle wurden zur Schätzung des Effektes von Geschlecht, Monat und Jahr auf die Wahrscheinlichkeit der Positivität für einzelne Pathogene verwendet. Ein Modell schloss die Habitate, das andere die verschiedenen Standorte mit ein. Gleichzeitig wurde ein Test über allgemeine Lineare Hypothese basierend auf einem vielfachen Vergleich mit durchschnittlichen Tukey Kontrasten durchgeführt, um die Unterschiede zwischen Geschlecht, Monat und Habitat bzw. Standort zu berechnen (Hothorn et al., 2008). Bei der statistischen Berechnung für die Prävalenz auf *Babesia* spp. und *Rickettsia* spp. wurde eine minimale Infektionsrate angenommen (in einem positiven Larvenpool wurde eine Larve als positiv angesehen). Die Variable „Standort R1“ wurde nicht für die statistische Berechnung der Babesienprävalenz in wirtssuchenden Zecken verwendet, da an diesem Standort keine positiven Zecken gefunden werden konnten. Die statistische Berechnung wurde mit der Software R Version 2.15.1 durchgeführt (R Development Core Team, 2012).

Der exakte Test nach Fisher wurde zur Untersuchung des Unterschieds der Prävalenz in wirtssuchenden und gesaugten Zecken, in den verschiedenen Zeckenstadien, dem Geschlecht (Zecken und Rehwild), dem Alter der Rehe und der Unabhängigkeit der Pathogene im Reh herangezogen (Fisher, 1935). Die genauen Konfidenzintervalle (CI 95%) wurden wie bei den wirtssuchenden Zecken mit der Clopper und Pearson Methode berechnet. Der Binomialtest wurde angewendet um die Ergebnisse von Blut-, Milz- und Hautproben von Rehwild zu vergleichen (Clopper and Pearson, 1934). Die statistische Analyse wurde wie bei den wirtssuchenden Zecken mit Software R Version 2.15.0 durchgeführt (R Development Core Team, 2012).

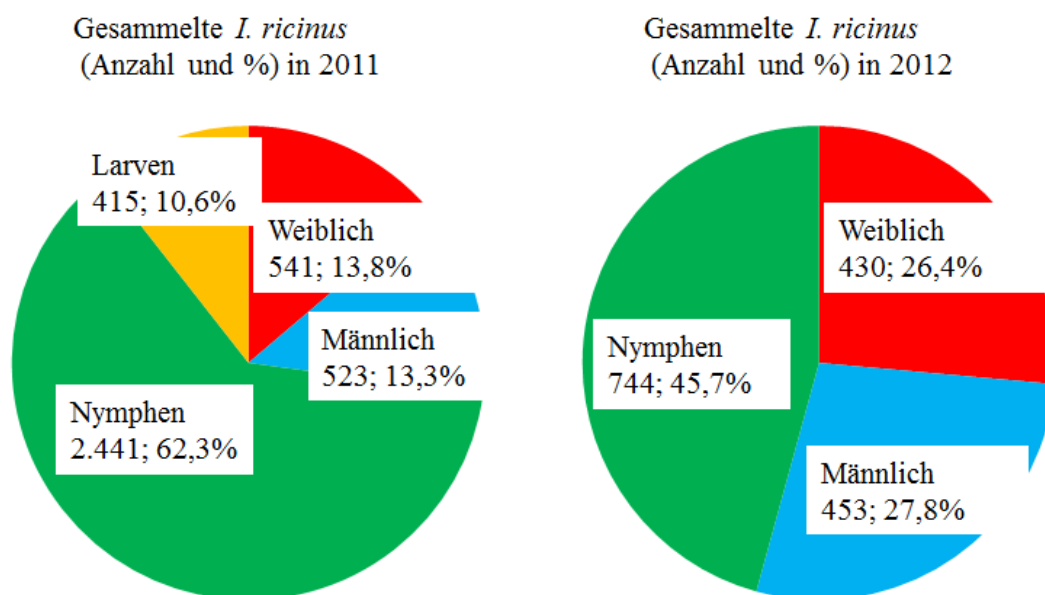
IV. ERGEBNISSE

1. Anzahl gesammelter Proben

1.1. Wirtssuchende Zecken

In den Jahren 2011 und 2012 wurden insgesamt 10.303 Zecken in den Monaten April, Mai und Juni an je sechs Standorten gesammelt. Im Jahr 2011 waren dies insgesamt 6.154 Zecken (866 weibliche, 931 männliche, 3.841 Nymphen, 516 Larven) und im Jahr 2012 insgesamt 4.149 Zecken (1.093 weibliche, 1.204 männliche, 1.737 Nymphen, 115 Larven). Alle gesammelten Zecken wurden anhand morphologischer Merkmale der Art *I. ricinus* zugeordnet. Der Vergleich der gefundenen Zeckendichte in den Jahren 2011 und 2012 wurde ausschließlich mit Zecken aus Streckenabschnitt I-III errechnet, da auf Abschnitt „A“ teilweise selektiv gesammelt wurde (Abb. 9). Das Verhältnis zwischen Adulten, Nymphen und Larven betrug im Jahr 2011 bzw. 2012 3:6:1 und 1:1:0.

Abb. 9: Jahresvergleich 2011/2012 der Anzahl auf Streckenabschnitt I-III gesammelter *I. ricinus* je Geschlecht und Entwicklungsstadium



1.2. Probenmaterial von Rehwild

1.2.1. Gesaugte Zecken

Insgesamt wurden 557 Zecken (426 weiblich, 131 männlich) von 44 Rehen (max. 1 bis 20 Zecken/Individuum) abgesammelt. Dabei handelte es sich ausschließlich um weibliche und männliche adulte Zecken der Art *I. ricinus*. Anschließend wurden davon 331 Zecken [206 weibliche, 125 männliche mit einem Maximum von 5 weiblichen und 5 männlichen gesaugten Zecken/Individuum] von 44 Rehen molekularbiologisch untersucht.

1.2.2. Blut-, Milz- und Hautproben

Von Dezember 2010 bis Januar 2012 wurden von insgesamt 95 Rehen unterschiedlichen Geschlechts und Alters (Tab. 7) 86 Blut-, 95 Milz- und 56 Hautproben genommen.

Tab. 7: Alter, Geschlecht und Allgemeinzustand der zwischen September 2010 und Januar 2012 untersuchten Rehwildindividuen im Angelberger Forst, Bayern, Deutschland

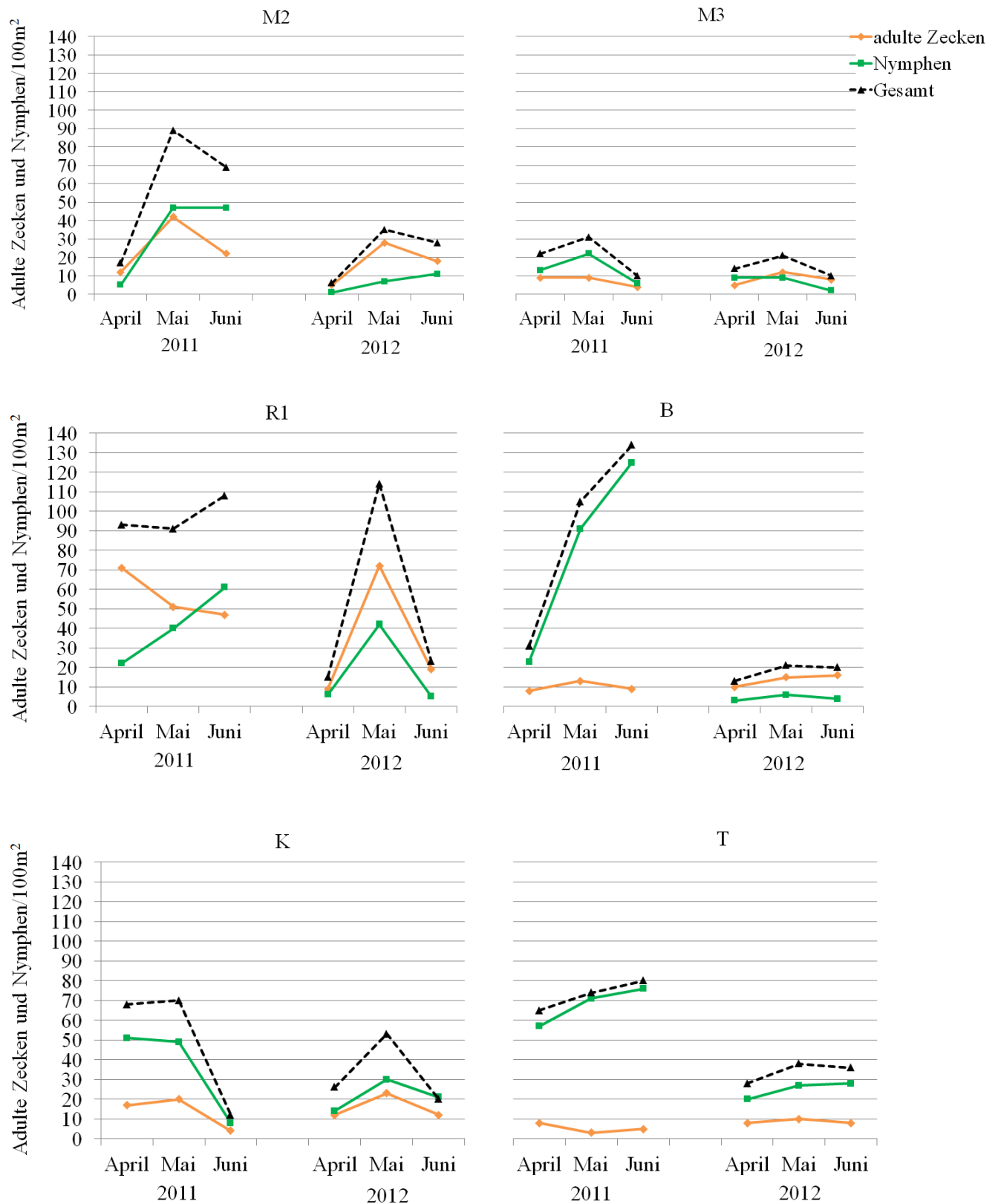
Geschlecht	Altersgruppe*				Allgemeinzustand*			
	Insgesamt	<1	1-2	>2	Sehr gut	Gut	Normal	Reduziert
Gesamt	95	27	48	20	3	24	65	3
Weiblich	52	17	24	11	1	12	38	1
Männlich	43	10	24	9	2	12	27	2

*Schätzung des Jägers

2. Zeckendichte

Die Zeckendichte wurde in den Monaten April bis Juni in beiden Untersuchungsjahren auf den Streckenabschnitten I-III an allen sechs Standorten vorgenommen und auf jeweils 100m² berechnet (Abb. 10, Tab. 8). Ergebnisse zur durchschnittlichen Zeckendichte pro Standort, Habitat, Monat und Jahr sind in Publikation 1 (Seite 49) zusammengefasst.

Abb. 10: Jahresvergleich der Zeckendichte in 2011 und 2012 (adulte Zecken und Nymphen) in den Sammelmonaten April, Mai und Juni je Standort pro 100m²



Tab. 8: Anzahl gefundener Zecken auf Streckenabschnitt I-III (300m²) je Standort, Monat und Jahr

Standort	Stadium bzw. Geschlecht**	Anzahl gefundener Zecken auf Streckenabschnitt I-III					
		2011			2012		
		April	Mai	Juni	April	Mai	Juni
M2*	W	17	67	36	9	47	28
	M	18	60	30	18	38	25
	N	15	140	141	8	20	32
	L	0	0	0	0	0	0
M3	W	15	14	4	8	18	14
	M	13	13	8	7	17	10
	N	38	66	18	27	28	7
	L	0	0	0	0	0	0
R1	W	110	88	70	13	98	21
	M	103	64	70	15	118	35
	N	67	120	183	17	127	14
	L	0	15	16	0	0	0
B	W	10	25	17	17	24	28
	M	14	15	10	13	22	20
	N	68	274	375	10	18	12
	L	0	14	96	0	0	0
K	W	19	22	6	13	39	15
	M	33	39	7	23	30	22
	N	153	148	24	43	91	63
	L	0	1	0	0	0	0
T	W	12	3	6	11	17	10
	M	12	6	8	12	14	14
	N	171	213	227	61	82	84
	L	38	99	136	0	0	0

*April 2012: aufgrund schlechter Witterungsverhältnisse wurden die Streckenabschnitte I-III an verschiedenen Tagen zweifach beprobt und somit die doppelte Anzahl der tatsächlich auf 300m² vorhandenen Zecken gesammelt und tabellarisch erfasst

**W=weibliche adulte Zecke, M=männliche adulte Zecke, N=Nymphe, L=Larve

3. NanoDrop

Die spektrophotometrische quantitative Messung der unverdünnten DNA-Extrakte ergab in den Proben die im Folgenden dargestellten DNA-Konzentrationen (minimal-maximal gemessene Werte).

3.1. Wirtssuchende Zecken

- Gesamt: 7,0 - 245,4 ng/ μ L
- Weiblich: 39,8 - 245,4 ng/ μ L
- Männlich: 10,9 - 63,0 ng/ μ L
- Nymphen: 7,0 - 46,3 ng/ μ L
- Larven (Pools von 1-5): 9,2 - 35,2 ng/ μ L

3.2. Probenmaterial von Rehwild

3.2.1. Gesaugte Zecken

- Gesamt: 14,3 - 3185,5 ng/ μ L
- Weiblich: 39,6 - 3185,5 ng/ μ L
- Männlich: 14,3 - 460,3 ng/ μ L

3.2.2. Blut-, Milz- und Hautproben

- Blut: 42,0 - 1263,5 ng/ μ L
- Milz: 26,9 - 4619,8 ng/ μ L
- Haut: 47,9 - 381,1 ng/ μ L

4. Untersuchung auf *Bartonella* spp.

Insgesamt wurden 33,7% (32/95) Milzproben positiv auf DNA von *Bartonella* spp. getestet. In den Hautproben konnte dieses Bakterium nicht nachgewiesen werden.

Alle PCR-Produkte wurden sequenziert. Die Sequenzanalyse der PCR-Produkte ergab 94-100% Ähnlichkeit zu in der GenBank hinterlegten Sequenzen von *Bartonella schoenbuchensis*, *Bartonella capreoli* und *Bartonella chomelii* (GenBank accession no: FN645524, AB498009, AB498010).

5. **Publikationen**

Die Ergebnisse bezüglich Zeckendichte, der Prävalenz von *Babesia* spp., *A. phagocytophilum*, *Rickettsia* spp., Unterschieden des partiellen *16S rRNA* Gens von *A. phagocytophilum*, Habitatdifferenzen, und Reservoirfunktion des Rehwirtes wurden in drei englischsprachigen Publikationen veröffentlicht.

5.1. Publikation 1

***Anaplasma phagocytophilum* in questing *Ixodes ricinus* ticks: a comparison of the prevalence and partial *16S rRNA* gene variants in urban, pasture and natural habitats**

Evelyn Overzier¹, Kurt Pfister¹, Claudia Thiel¹, Ingrid Herb², Monia Mahling², Cornelia Silaghi¹

Applied and Environmental Microbiology March 2013, Vol. 79 No. 5 1730-1734

Impact Factor: 3.829

¹Comparative Tropical Medicine and Parasitology, Ludwig-Maximilians-Universität München, Munich, Germany

²Statistical Consulting Unit, Department of Statistics, Ludwig-Maximilians-Universität München, Munich, Germany

***Anaplasma phagocytophilum* in questing *Ixodes ricinus* ticks: a comparison of the prevalence and partial *16S rRNA* gene variants in urban, pasture and natural habitats**

Evelyn Overzier¹, Kurt Pfister¹, Claudia Thiel¹, Ingrid Herb², Monia Mahling², Cornelia Silaghi¹

¹Comparative Tropical Medicine and Parasitology, Ludwig-Maximilians-Universität München, Munich, Germany

²Statistical Consulting Unit, Department of Statistics, Ludwig-Maximilians-Universität München, Munich, Germany

Corresponding author:

Evelyn Overzier

Comparative Tropical Medicine and Parasitology

Ludwig-Maximilians-Universität München

Leopoldstr. 5

80802 Munich

Tel: +49 (0)89 2180 - 2816

Fax: +49 (0)89 2180 - 3623

Email addresses:

EO: evelyn.overzier@tropa.vetmed.uni-muenchen.de

KP: kurt.pfister@tropa.vetmed.uni-muenchen.de

CT: claudia.thiel@tropa.vetmed.uni-muenchen.de

IH: stablabb.herb@gmx.de

MM: Monia.Mahling@stat.uni-muenchen.de

CS: cornelia.silaghi@tropa.vetmed.uni-muenchen.de

Abstract

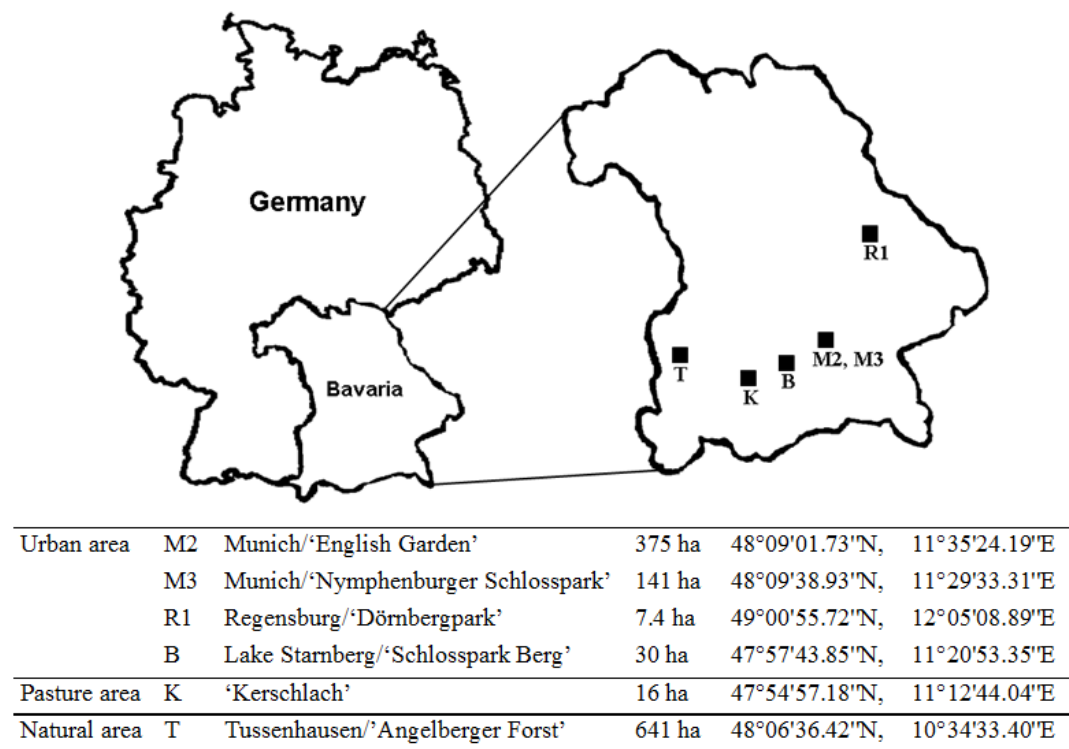
Urban, natural and pasture areas were investigated for prevalence and *16S rRNA* gene variants of *A. phagocytophilum* in questing *Ixodes ricinus* ticks. The prevalence differed significantly between habitat types and a year to year variation in prevalence as well as habitat-dependent occurrence of *16S rRNA* gene variants was detected.

Keywords: *Anaplasma phagocytophilum*, *Ixodes ricinus*, reservoir host, habitat structure, prevalence

Text

The obligate intracellular bacterium *Anaplasma* (*A.*) *phagocytophilum* is transmitted by *Ixodes* (*I.*) *ricinus* ticks in Europe [1] and causes granulocytic anaplasmosis in humans and several other mammalian species [2-5]. Reservoir hosts are necessary to maintain the endemic cycle of *A. phagocytophilum* (transstadial, but not a transovarial transmission [6]). Different host species seem to be susceptible for different genetic variants of this pathogen, with potentially differing pathogenicity [1, 7]. The aim of this study was to compare the prevalence of *A. phagocytophilum* and the variability in *16S rRNA* gene variants of *A. phagocytophilum* as well as the density of questing *I. ricinus* ticks collected in 2011 and 2012 from six study sites in Bavaria/Germany (structured in three different habitats - urban, pasture, natural) with regard to the occurrence of various potential reservoir hosts.

[Figure 1; further description of study sites will be published elsewhere (Overzier et al. submitted for publication)].

Figure 1. Location of sampling sites

In April, May and June 2011 and 2012 respectively, questing ticks were collected with the flagging method on 300m² transects on each study site. DNA was extracted automatically with the Maxwell[®] 16 System (Promega, Mannheim, Germany). DNA concentration was measured spectro-photometrically (Nano Drop[®] ND-1000, PeqLab Erlangen, Germany). The *msp2*-gene of *A. phagocytophilum* was detected by SYBR-Green real time PCR in the AB 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems[®], Darmstadt, Germany) as described [8]. An assortment of positive samples was investigated with a nested PCR targeting the *16S rRNA* gene to detect different gene variants [9, 10]. Positive PCR products were purified, sequenced and analysed as described [8]. All sequences were compared with sequences from previous studies by our group [4, 8, 10-13].

Exact confidence intervals of prevalence in ticks (CI 95%) were computed with the Clopper and Pearson method [14]. Two logistic regression models were estimated to investigate the effect of gender, month and year on the probability of ticks being positive for *A. phagocytophilum*. One model also included habitat and another one the different sites. A simultaneous test for general linear hypotheses based on multiple comparisons of means with Tukey Contrasts [15] was used to test for differences between gender, month, habitat and site respectively. Statistical analysis was performed with R version 2.15.1 [16].

Overall 9,672 *I. ricinus* were collected with an average tick density (ticks/100m²) range in the urban area between 21 and 97 ticks/100m² in 2011 and 15 and 51 ticks/100m² in 2012. On the pasture the tick density was 50 and 38 ticks/100m² and in the natural area 73 and 34 ticks/100m² in 2011 and 2012 (Table 1). The mean value of the ratio of adults and nymphs was 1:2.3 (2011) and 1:0.9 (2012) respectively (Table 1).

Table 1: Absolute and average tick density (*Ixodes ricinus*: adults and nymphs/100m²) per site in April, May and June and relationship of stages in 2011 and 2012

Habitat	Site	Tick density/100m ²													
		April		May		June		Mean		A *	N **	ratio	A *	N **	ratio
		2011	2012	2011	2012	2011	2012	2011	2012	2011			2012		
Urban	English Garden (M2)	17	6	89	35	69	28	58	19	25	33	1:1.3	17	6	1:0.4
	Nymphenburger Schlosspark (M3)	22	14	31	21	10	10	21	15	7	14	1:2.0	8	7	1:0.9
	Dörnbergpark (R1)	93	15	91	114	108	23	97	51	56	41	1:0.7	33	18	1:0.5
	Berg (B)	31	13	105	21	134	20	90	18	10	80	1:8.0	14	4	1:0.3
	Mean	41	12	79	48	80	20	67	26	25	42	1:1.7	18	9	1:0.5
Pasture	Kerschlach (K)	68	26	70	53	12	33	50	38	14	36	1:2.6	16	22	1:1.4
Natural	Angelberger Forst (T)	65	28	74	38	80	36	73	34	5	68	1:13.6	9	25	1:2.8
All sites	Mean	49	17	77	47	69	25	65	29	20	45	1:2.3	16	14	1:0.9

* A= adults, ** N=nymphs

A total of 214/4,064 questing ticks samples were positive for DNA of *A. phagocytophilum* with mean prevalence in 2011 and 2012 respectively: urban: 4.9% and 7.4%, pasture: 1.1% and 2.8% and natural: 4.0% and 5.8% (Tables 2 and 3). No significant difference was detected between collection months, but the overall prevalence of *A. phagocytophilum* was significantly higher in 2012 than in 2011 ($p<0.01$) (Tables 2 and 3). Adults showed a significantly higher prevalence than nymphs ($p<0.001$). The prevalence was significantly lower on the pasture than in the urban ($p<0.001$) and natural area ($p<0.01$). Study site R1 showed a significantly higher prevalence than all other study sites ($p<0.001$). Study site B showed a significantly lower prevalence than study sites M2 ($p<0.05$) and T (natural area, $p<0.01$).

Table 2: Prevalence and 95% Confidence interval of *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* ticks per site for 2011 and 2012

Habitat	Site	Year	Adult ticks		Females			Males			Nymphs		
			Pos/No. total	%	Pos/No. total	%	95%CI ¹⁾	Pos/No. total	%	95%CI ¹⁾	Pos/No. total	%	95%CI ¹⁾
Urban	M2	2011	9/240	3.8	2/120	1.7	0.2-5.9	7/120	5.8	2.4-11.6	1/120	0.8	0.0-4.6
		2012	20/240	8.3	8/120	6.7	2.9-12.7	12/120	10.0	5.3-16.8	5/118	4.2	1.4-9.6
	M3	2011	14/259	5.4	9/135	6.7	3.1-12.3	5/124	4.0	1.3-9.2	0/140	0.0	0.0-2.6
		2012	10/232	4.3	6/115	5.2	1.9-11.0	4/117	3.4	0.9-8.5	2/120	1.7	0.2-5.9
	R1	2011	39/240	16.3	16/120	13.3	7.8-20.7	23/120	19.2	12.6-27.4	2/120	1.7	0.2-5.9
		2012	54/235	23.0	26/115	22.6	15.3-31.3	28/120	23.3	16.1-31.9	7/120	5.8	2.4-11.6
	B	2011	2/150	1.3	2/79	2.5	0.3-8.8	0/71	0.0	0.0-5.1	1/120	0.8	0.0-4.6
		2012	6/240	2.5	3/120	2.5	0.5-7.1	3/120	2.5	0.5-7.1	0/106	0.0	0.0-3.4
	Total	2011	64/889	7.2	29/454	6.4	4.3-9.1	35/435	8.0	5.7-11.0	4/500	0.8	0.2-2.0
		2012	90/947	9.5	43/470	9.1	6.7-12.1	47/477	9.9	7.3-12.9	14/464	3.0	1.7-5.0
Pasture	K	2011	4/225	1.8	2/93	2.2	0.3-7.6	2/132	1.5	0.2-5.4	0/140	0.0	0.0-2.6
		2012	10/234	4.3	7/114	6.1	2.5-12.2	3/120	2.5	0.5-7.1	0/120	0.0	0.0-3.0
Natural	T	2011	7/79	8.9	2/33	6.1	0.7-20.2	5/46	10.9	3.6-23.6	1/120	0.8	0.0-4.6
		2012	17/226	7.5	11/109	10.1	5.1-17.3	6/117	5.1	1.9-10.8	3/120	2.5	0.5-7.1
All sites	Total	2011	75/1193	6.3	33/580	5.7	3.9-7.9	42/613	6.9	5.0-9.1	5/760	0.7	0.2-1.5
		2012	117/1407	8.3	61/693	8.8	6.8-11.2	56/714	7.8	6.0-10.1	17/704	2.4	1.4-3.8

1) Confidence interval

A total of 116/214 positive samples were sequenced. Alignment of 497 base pairs of the partial *16S rRNA* gene sequences revealed 9 variants with 99 to 100% identity to each other and to sequences previously deposited in GenBank (Table 4; incl. accession nos. of sequences deposited in GenBank).

Table 3: Prevalence and 95% Confidence interval of *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* ticks per month for 2011 and 2012

Month	Year	Site	Adults		Female			Male			Nymph		
			Pos/No. total	%	Pos/No. total	%	95%CI ¹⁾	Pos/No. total	%	95%CI ¹⁾	Pos/No. total	%	95%CI ¹⁾
April	2011	Urban	18/283	6.4	8/141	5.7	2.5-10.9	10/142	7.0	3.4-12.6	3/160	1.9	0.4-5.4
		Pasture	2/54	3.7	1/21	4.8	0.1-23.8	1/33	3.0	0.1-15.8	0/40	0.0	0.0-8.8
		Natural	3/29	10.3	2/13	15.4	1.9-45.4	1/16	6.3	0.2-30.2	0/40	0.0	0.0-8.8
		Total	23/366	6.3	11/175	6.3	3.2-11.0	12/191	6.3	3.3-12.2	3/240	1.3	0.3-3.6
	2012	Urban	42/312	13.5	22/155	14.2	9.1-20.7	20/157	12.7	8.0-19.0	2/146	1.4	0.2-4.9
		Pasture	0/79	0.0	0/39	0.0	0.0-9.0	0/40	0.0	0.0-8.8	0/40	0.0	0.0-8.8
		Natural	10/74	13.5	6/34	17.6	6.8-34.5	4/40	10.0	2.8-23.7	0/40	0.0	0.0-8.8
		Total	52/465	11.2	28/228	12.3	8.3-17.3	24/237	10.1	6.6-14.7	2/226	0.9	0.1-3.2
May	2011	Urban	28/317	8.8	13/160	8.1	4.4-13.5	15/157	9.6	5.5-15.3	0/160	0.0	0.0-2.3
		Pasture	2/79	2.5	1/39	2.6	0.1-13.5	1/40	2.5	0.1-13.2	0/40	0.0	0.0-8.8
		Natural	1/28	3.6	0/8	0.0	0.0-36.9	1/20	5.0	0.1-24.9	0/40	0.0	0.0-8.8
		Total	31/424	7.3	14/207	6.8	3.8-11.1	17/217	7.8	4.6-12.2	0/240	0.0	0.0-1.5
	2012	Urban	23/320	7.2	8/160	5.0	2.2-9.6	15/160	9.4	5.3-15.0	4/158	2.5	0.7-6.3
		Pasture	3/80	3.8	2/40	5.0	0.6-16.9	1/40	2.5	0.1-13.2	0/40	0.0	0.0-8.8
		Natural	3/78	3.8	2/38	5.3	0.6-17.7	1/40	2.5	0.1-13.2	3/40	7.5	1.6-20.4
		Total	29/478	6.1	12/238	5.0	2.6-8.6	17/240	7.1	4.2-11.1	7/238	2.9	1.2-6.0
June	2011	Urban	18/289	6.2	8/153	5.2	2.3-10.0	10/136	7.4	3.6-13.11	1/180	0.6	0.0-3.1
		Pasture	0/92	0.0	0/33	0.0	0.0-10.6	0/59	0.0	0.0-6.1	0/60	0.0	0.0-6.0
		Natural	3/22	13.6	0/12	3.0	0.0-26.5	3/10	30.0	6.7-65.2	1/40	2.5	0.0-13.2
		Total	21/403	5.2	8/198	4.0	1.8-7.8	13/205	6.3	3.4-10.6	2/280	0.7	0.1-2.6
	2012	Urban	25/315	7.9	13/155	8.4	4.5-13.9	12/160	7.5	3.9-12.7	8/160	5.0	2.2-9.6
		Pasture	7/75	9.3	5/35	14.3	4.8-30.3	2/40	5.0	0.6-16.9	0/40	0.0	0.0-8.8
		Natural	4/74	5.4	3/37	8.1	1.7-21.9	1/37	2.7	0.1-14.2	0/40	0.0	0.0-8.8
		Total	36/464	7.8	21/227	9.3	5.8-13.8	15/237	6.3	3.6-10.2	8/240	3.3	1.4-6.5

1) Confidence interval

Table 4: *16S rRNA* gene variants of *Anaplasma phagocytophilum* in 116 samples of questing ticks with single nucleotide substitutions in the 497-bp sequence compared with GenBank sequences

Sequence variant ¹⁾	n	Habitat ²⁾	Sampling site (no. of samples with variants)	Hosts found in other studies (GenBank accession no) ³⁾	GenBank accession nos. of sequences found in this study	Nucleotide position ⁴⁾						
						74	76	78	80	84	170	376
A	80	u	M2 (16), M3 (9), R (55)	<i>Ixodes ricinus</i> (JN181064), <i>Dermacentor reticulatus</i> (JN181063), dog (<i>Canis lupus familiaris</i>) (FJ829761), European hedgehog (<i>Erinaceus europaeus</i>) (JN571156), cat (<i>Felis domesticus</i>) (HM138366), human (GU236655)	JX909353	A	A	A	A	G	C	A
P	1	u	M2	N.M. ⁵⁾	JX909354	G	A	A	A	G	C	A
Z	1	u	M3	<i>Ixodes ricinus</i> (EU490523), goat (<i>Capra aegagrus hircus</i>) (FJ538290)	JX909355	A	A	A	A	G	T	A
W	1	p	K	<i>Ixodes ricinus</i> (JN181071), <i>Ixodes persulcatus</i> (HM366582), northern red-backed vole (<i>Myodes rutilus</i>) (HQ630622), bank vole (<i>Myodes glareolus</i>) (AY094353), common shrew (<i>Sorex araneus</i>) (HQ630623), hedgehog (JN571163), coyote (<i>Canis latrans</i>) (AF170728), dog (AY741098), horse (<i>Equus caballus</i>) (AF172167), cattle (<i>Bos taurus</i>) (JQ026308), llama (<i>Lama glama</i>) (AF241532), mouflon (<i>Ovis musimon</i>) (EU839851), chamois (<i>Rupicapra rupicapra</i>) (FJ812399), red deer (<i>Cervus elaphus</i>) (GQ428331), sheep (<i>Ovis aries</i>) (GQ428333), roe deer (<i>Capreolus capreolus</i>) (JX627363), wild boar (<i>Sus scrofa</i>) (GU391313), human (<i>Homo sapiens</i>) (AF093789)	JX909356	A	A	A	A	A	C	G
O	1	n	T	Roe deer (GU236538)	JX627370	A	G	G	A	G	C	G
V	3	u, n	M3 (1), T (2)	<i>Ixodes ricinus</i> (FJ788512), dog (JN656381), hedgehog (JN571162), roe deer (JX627362)	JX909357	A	A	A	G	A	C	G
B	3	p, n	K (2), T (1)	<i>Ixodes ricinus</i> (HQ629917), <i>Ixodes ovatus</i> (AY969015), <i>Haemaphysalis longicornis</i> (GU064899), vulture (<i>Falconiformes</i>) (JN217095), cottontail rabbit (<i>Sylvilagus floridanus</i>) (AY144728), white-footed mouse (<i>Peromyscus leucopus</i>) (U72878), European hedgehog (JN571159), dog (FJ829787), horse (JF893938), red deer (EU839850), roe deer (EU839848), human (AY886761, U02521)	JX909358	A	A	A	A	G	C	G
X	8	u,p,n	B (3), K (2), T (3)	<i>Ixodes ricinus</i> (HQ629923), <i>Ixodes scapularis</i> (AF311343), goat (FJ538288), roe deer (HM480381)	JX909359	A	G	A	A	A	C	G
Y	18	u,p,n	M3 (7), B (2), K (3), T (6)	<i>Ixodes ricinus</i> (JN181069), cotton rat (<i>Sigmodon hispidus</i>) (JQ063025), goat (FJ538289), mouflon (FJ812409), roe deer (HM480385)	JX909360	A	G	A	A	G	C	G
				<i>Anaplasma phagocytophilum</i> HZ complete genome (NC_007797)		A	A	A	A	G	C	G

1) No official nomenclature but has been used in previous studies [8, 12]

2) u=urban area, p=pasture area, n=natural area

3) list not exhaustive

4) *Anaplasma phagocytophilum* HZ complete genome (GenBank accession no. NC_007797) was used as reference strain: Nucleotide positions indicate the relative position to the 1433 bp of the *rrsA 16S ribosomal RNA* gene [Gene ID:3930754]. Bold indicates nucleotide differences compared to complete genome

5) No match with sequences in GenBank

Our results support the hypothesis that the prevalence and genetic variants of *A. phagocytophilum* vary depending on habitat structures and the occurrence of different potential reservoir hosts. Comparing the results of the urban sites with results from the same sites from a previous study during 2009 and 2010 [8], an overall continuous decrease followed by an increase in prevalence was detected. This might depend on more global factors affecting all sites such as the weather conditions during those years, the overall appearance of the vector *I. ricinus* and/or the appearance of common reservoir hosts and not on habitat structure or other factors on single sites. Prevalence of *A. phagocytophilum* in ticks

(which had their last blood meal one or two year prior to this investigation) depends on prevalence in the reservoir hosts. Consequently changes of *A. phagocytophilum* prevalence in reservoir hosts are detected temporally delayed by the prevalence in questing ticks.

We detected 9 different *16S rRNA* gene variants of *A. phagocytophilum* with variations in study sites. In urban sites R1 and M2, variant 'A' was found most. This confirms the *16S rRNA* gene variants found on these study sites in 2009 and 2010 [8]. Variant 'A' has not been detected in wild ungulates in our investigations yet [12, 24]. Furthermore, as wild ungulates are rare to not existent on study site R1 and M2 there must be other reservoir hosts present like foxes, small rodents, hedgehog, squirrels or birds [13, 17-21]. Variant 'A' has also been detected in a human patient [22] and in granulocytic anaplasmosis cases in horses and dogs [3, 4]. It has been discussed previously whether this variant may be less pathogenic [3]. This might explain the discrepancy between the high prevalence in questing ticks in urban areas and the lack of clinical human cases in Germany. More in-depth and experimental studies on the pathogenic potential of this variant are needed to elucidate this hypothesis. Further efforts to find the main reservoir host for *A. phagocytophilum* in urban areas are necessary. In the urban site M3 wild game exists and besides variant 'A', variant 'Y' was detected which was previously found in roe deer [12, 22]. Variant 'Y' was also detected in the other study sites where wild ungulates exist whereas it was not detected in those city parks without large ungulate species. These findings confirm results from 2009 and 2010 [8]. On the pasture where mainly cattle are kept, variant 'B' and 'W' were additionally found. Variant 'B' is in the amplified *16S rRNA* gene part identical to the prototype variant of *A. phagocytophilum* from human clinical cases and is also frequently detected in horses and dogs with granulocytic anaplasmosis [3, 4]. Variant 'W' was evidenced mainly in sheep and cattle with tick-borne fever in previous studies [5, 23]. In the natural and pasture area as well as in the forest-like park (site B) variant 'X' was also found. Furthermore it was detected in 44% of sequenced *A. phagocytophilum* positive roe deer samples in the natural area in 2010/2011 [24].

In conclusion prevalence rates and occurrence of partial *16S rRNA* gene variants of *A. phagocytophilum* differed in all habitats investigated in our study most likely depending on the habitat structure and therefore appearance and availability of typical reservoir hosts. Furthermore a year-to-year variation could be detected unaffected by the habitat structure suggesting the involvement of more global factors in the occurrence of *A. phagocytophilum* in ticks.

Acknowledgments

The authors address special thanks to Tim Tiedemann for assistance in laboratory work. This study was partially funded by EU grant FP7-261504 EDENext and is catalogued by the EDENext Steering Committee as EDENext079 (<http://www.edenext.eu/>). The contents of this publication are the sole responsibility of the authors and do not necessarily reflect the views of the European Commission.

References

1. Woldehiwet, Z, The natural history of *Anaplasma phagocytophilum*. Vet Parasitol, 2010. **167**(2-4): p. 108-22.
2. Heikkilä, HM, Bondarenko, A, Mihalkov, A, Pfister, K, Spillmann, T, *Anaplasma phagocytophilum* infection in a domestic cat in Finland: Case report. Acta Vet Scand, 2010. **52**: p. 62.
3. Silaghi, C, Kohn, B, Chirek, A, Thiel, C, Nolte, I, Liebisch, G, Pfister, K, Relationship of molecular and clinical findings on *Anaplasma phagocytophilum* involved in natural infections of dogs. J Clin Microbiol, 2011. **49**(12): p. 4413-4.
4. Silaghi, C, Liebisch, G, Pfister, K, Genetic variants of *Anaplasma phagocytophilum* from 14 equine granulocytic anaplasmosis cases. Parasit Vectors, 2011. **4**: p. 161.
5. Nieder, M, Silaghi, C, Hamel, D, Pfister, K, Schmaschke, R, Pfeffer, M, Tick-borne fever caused by *Anaplasma phagocytophilum* in Germany. First laboratory confirmed case in a dairy cattle herd. Tierarztl Prax Ausg G Grosstiere Nutztiere, 2012. **40**(2): p. 101-6.
6. Ogden, NH, Bown, K, Horrocks, BK, Woldehiwet, Z, Bennett, M, Granulocytic *Ehrlichia* infection in Ixodid ticks and mammals in woodlands and uplands of the U.K. Med Vet Entomol, 1998. **12**(4): p. 423-9.
7. Foley, JE, Nieto, NC, Massung, R, Barbet, A, Madigan, J, Brown, RN, Distinct ecologically relevant strains of *Anaplasma phagocytophilum*. Emerg Infect Dis, 2009. **15**(5): p. 842-3.

8. Schorn, S, Pfister, K, Reulen, H, Mahling, M, Manitz, J, Thiel, C, Silaghi, C, Prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* in Bavarian public parks, Germany. Ticks Tick Borne Dis, 2011. **2**(4): p. 196-203.
9. Massung, RF, Slater, K, Owens, JH, Nicholson, WL, Mather, TN, Solberg, VB, Olson, JG, Nested PCR assay for detection of granulocytic ehrlichiae. J Clin Microbiol, 1998. **36**(4): p. 1090-5.
10. Silaghi, C, Scheuerle, MC, Friche Passos, LM, Thiel, C, Pfister, K, PCR detection of *Anaplasma phagocytophilum* in goat flocks in an area endemic for tick-borne fever in Switzerland. Parasite, 2011. **18**(1): p. 57-62.
11. Silaghi, C, Gilles, J, Höhle, M, Fingerle, V, Just, FT, Pfister, K, *Anaplasma phagocytophilum* infection in *Ixodes ricinus*, Bavaria, Germany. Emerg Infect Dis, 2008. **14**(6): p. 972-4.
12. Silaghi, C, Hamel, D, Thiel, C, Pfister, K, Passos, LM, Rehbein, S, Genetic variants of *Anaplasma phagocytophilum* in wild caprine and cervid ungulates from the Alps in Tyrol, Austria. Vector Borne Zoonotic Dis, 2011. **11**(4): p. 355-62.
13. Silaghi, C, Skuballa, J, Thiel, C, Pfister, K, Petney, T, Pfaffle, M, Taraschewski, H, Passos, LM, The European hedgehog (*Erinaceus europaeus*)--a suitable reservoir for variants of *Anaplasma phagocytophilum*? Ticks Tick Borne Dis, 2012. **3**(1): p. 49-54.
14. Clopper, CJ, Pearson, ES, The use of confidence or fiducial limits illustrated in the case of the binomial. Biometrika, 1934. **26**: p. 404-413.
15. Hothorn, T, Bretz, F, Westfall, P, Simultaneous Inference in General Parametric Models. Biometric Journal, 50 (3), 346-363., 2008.
16. R Development Core Team, R: A language and environment for statistical computing. Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria., 2012. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.

17. Liz, JS, Anderes, L, Sumner, JW, Massung, RF, Gern, L, Rutti, B, Brossard, M, PCR detection of granulocytic ehrlichiae in *Ixodes ricinus* ticks and wild small mammals in western Switzerland. J Clin Microbiol, 2000. **38**(3): p. 1002-7.
18. Petrovec, M, Sixl, W, Schweiger, R, Mikulasek, S, Elke, L, Wüst, G, Marth, E, Strasek, K, Stünzner, D, Avsic-Zupanc, T, Infections of wild animals with *Anaplasma phagocytophila* in Austria and the Czech Republic. Ann N Y Acad Sci, 2003. **990**: p. 103-6.
19. Franke, J, Fritsch, J, Tomaso, H, Straube, E, Dorn, W, Hildebrandt, A, Coexistence of pathogens in host-seeking and feeding ticks within a single natural habitat in Central Germany. Appl Environ Microbiol, 2010. **76**(20): p. 6829-36.
20. Nieto, NC, Leonhard, S, Foley, JE, Lane, RS, Coinfection of western gray squirrel (*Sciurus griseus*) and other sciurid rodents with *Borrelia burgdorferi* sensu stricto and *Anaplasma phagocytophilum* in California. J Wildl Dis, 2010. **46**(1): p. 291-6.
21. Nieto, NC, Foley, JE, Evaluation of squirrels (Rodentia: Sciuridae) as ecologically significant hosts for *Anaplasma phagocytophilum* in California. J Med Entomol, 2008. **45**(4): p. 763-9.
22. Scharf, W, Schauer, S, Freyburger, F, Petrovec, M, Schaarschmidt-Kiener, D, Liebisch, G, Runge, M, Ganter, M, Kehl, A, Dumler, JS, Garcia-Perez, AL, Jensen, J, Fingerle, V, Meli, ML, Ensser, A, Stuen, S, von Loewenich, FD, Distinct host species correlate with *Anaplasma phagocytophilum ankA* gene clusters. J Clin Microbiol, 2011. **49**(3): p. 790-6.
23. Stuen, S, Van De Pol, I, Bergström, K, Schouls, LM, Identification of *Anaplasma phagocytophila* (formerly *Ehrlichia phagocytophila*) variants in blood from sheep in Norway. J Clin Microbiol, 2002. **40**(9): p. 3192-7.
24. Overzier E, Pfister K, Herb I, Mahling M, Böck G, Jr, Silaghi C. Detection of tick-borne pathogens in roe deer (*Capreolus capreolus*), questing ticks(*Ixodes ricinus*) and ticks infesting roe deer in southern Germany. Ticks Tick-Borne Dis., in press.

5.2. Publikation 2

Detection of tick-borne pathogens in roe deer (*Capreolus capreolus*), questing ticks (*Ixodes ricinus*) and ticks infesting roe deer in southern Germany

Evelyn Overzier¹, Kurt Pfister¹, Ingrid Herb², Monia Mahling², Georg Böck jun.¹, Cornelia Silaghi¹

Ticks and Tick-Borne Diseases (2013), Impact Factor: 2.370

Accepted for publication 13.01.2013

¹Comparative Tropical Medicine and Parasitology, Ludwig-Maximilians-Universität München, Munich, Germany

²Statistical Consulting Unit, Department of Statistics, Ludwig-Maximilians-Universität München, Munich, Germany

Detection of tick-borne pathogens in roe deer (*Capreolus capreolus*), questing ticks (*Ixodes ricinus*) and ticks infesting roe deer in southern Germany

Evelyn Overzier¹, Kurt Pfister¹, Ingrid Herb², Monia Mahling², Georg Böck jun.¹, Cornelia Silaghi¹

¹Comparative Tropical Medicine and Parasitology, Ludwig-Maximilians-Universität München, Munich, Germany

²Statistical Consulting Unit, Department of Statistics, Ludwig-Maximilians-Universität München, Munich, Germany

Corresponding author:

Evelyn Overzier

Comparative Tropical Medicine and Parasitology

Ludwig-Maximilians-Universität-München

Leopoldstr. 5

80802 Munich

Tel: +49 (0)89 2180 - 2816

Fax: +49 (0)89 2180 - 3623

Email addresses:

EO: evelyn.overzier@tropa.vetmed.uni-muenchen.de

KP: kurt.pfister@tropa.vetmed.uni-muenchen.de

IH: stablab.herb@gmx.de

MM: Monia.Mahling@stat.uni-muenchen.de

GB: georgboeck@gmx.de

CS: cornelia.silaghi@tropa.vetmed.uni-muenchen.de

Abstract

The hard tick *Ixodes ricinus* is the most common tick in Central Europe and plays an important role as a vector of several pathogens. In the complex life cycles of those pathogens, the role of wild animals as natural reservoirs has been discussed. The aims of this study were to investigate the role of roe deer (*Capreolus capreolus*) as potential reservoir host for *Babesia* spp., *Anaplasma phagocytophilum* and *Rickettsia* spp.. Therefore, we explored the difference in infection rates of roe deer and engorged and questing ticks with these pathogens from a single forest site with special attention to co-infection.

Blood, spleen and skin samples of a total of 95 roe deer individuals were screened by molecular methods for these pathogens from September 2010 to January 2012 in the ‘Angelberger Forst’ (Bavaria, Germany). Moreover, 331 engorged ticks from 44 roe deer individuals and 199 host-seeking ticks from the same area were screened.

Altogether, the following prevalence rates and a high diversity of species were detected for the respective pathogens in individual animals and ticks: (i) *Babesia* spp.: roe deer: 89.5 %; engorged ticks: 7.3 %; questing ticks: adults: 2.5 %, nymphs: 3.3 %. Sequencing revealed *B. venatorum*, *B. capreoli* and *B. microti*. (ii) *A. phagocytophilum*: roe deer: 98.9 %; engorged ticks: 86.1 %; questing ticks: adults: 8.9 %, nymphs: 0.8 %. (iii) *Rickettsia* spp.: roe deer: 0 %; engorged ticks: 16.6 %; questing ticks: adults: 13.9 %, nymphs: 17.5 %. Sequencing revealed *R. helvetica*. Furthermore, several co-infections were detected in both roe deer and ticks. The high prevalence rates of *B. capreoli* and *A. phagocytophilum* in roe deer support their role as reservoir hosts for these pathogens, but no evidence for a role of roe deer in the life cycle of *R. helvetica* could be provided.

Keywords: roe deer; *Ixodes ricinus*; *Babesia* spp.; *Anaplasma phagocytophilum*; *Rickettsia* spp.; Germany

Introduction

The hard tick *Ixodes ricinus* is the most common tick species in Germany and plays an important role as a vector of several pathogens in Europe. Amongst these pathogens are potentially human pathogenic protozoa and bacteria such as *Babesia microti*, *B. venatorum* (also named *Babesia* sp. EU1 in previous literature), *Anaplasma phagocytophilum* and *Rickettsia helvetica* [reviewed in (Heyman et al., 2010)].

Roe deer serves as a host for *B. capreoli* (Malandrin et al., 2010) and *B. venatorum* (Bonnet et al., 2007; Duh et al., 2005). The latter has been reported associated to human disease (Häselbarth et al., 2007; Herwaldt et al., 2003). *B. microti* is mainly found in voles and mice (Duh et al., 2003) and a human case has also been reported in Europe (Hildebrandt et al., 2007). *A. phagocytophilum* causes human (Petrovec et al., 1997), equine (Silaghi et al., 2011e), canine (Kohn et al., 2011) and feline (Heikkilä et al., 2010) granulocytic anaplasmosis and tick borne fever in ruminants (Nieder et al., 2012). Wild ruminants such as roe deer show high infection rates with *A. phagocytophilum* and have been suggested as reservoir hosts (Liz et al., 2002; Oporto et al., 2003; Polin et al., 2004; Skarphéðinsson et al., 2005; Stefanidesova et al., 2008). No clinical case of granulocytic anaplasmosis in humans has yet been documented in Germany, but serological evidence of previous infection was detected in persons at high risk for exposure to *I. ricinus* (Fingerle et al., 1997). *Rickettsia* spp. cause tick- or flea-borne rickettsioses in humans. *R. slovaca* (Silaghi et al., 2011c), *R. helvetica* (Silaghi et al., 2011c), *R. felis* (Dobler and Wölfel, 2009), *R. monacensis* (Silaghi et al., 2008b), *R. massiliae* (Dobler and Wölfel, 2009) and *R. raoultii* (Silaghi et al., 2011c) have been recorded in Germany. The vertebrate reservoirs of some *Rickettsia* spp. are unknown. However, rodents are presumed reservoirs of *R. helvetica* (Schex et al., 2011).

The aims of this study were:

- to determine the prevalence of *Babesia* spp., *A. phagocytophilum* and *Rickettsia* spp. in roe deer and *I. ricinus* (engorged and questing ticks) with molecular methods
- to identify the pathogen species by sequencing with special attention to co-infection
- to analyze the differences in infection rates with the pathogens in roe deer, engorged and questing ticks with statistical methods and thus
- to analyze the role of roe deer as potential reservoir host for *Babesia* spp., *A. phagocytophilum* and *Rickettsia* spp.

Material and Methods

Study site. The study site ‘Angelberger Forst’ is a 641 hectare wide forest area (48°06’36.42”N, 10°34’33.40”E) located 580-660 m above sea level near Tussenhausen (Bavaria, Germany). The climate is intermediate with 950-1000 mm rainfall/year. The average temperature balances between 6.5 to 7.5 °C. The vegetation is mixed forest with mainly beech-grove (*Fagus sylvatica*), in places fir (*Abies*), oak (*Quercus*) and spruce (*Picea*) on fine loam (Forstdirektion Oberbayern-Schwaben, 2004). More than 100 different bird species are common in the ‘Angelberger Forst’ (Bezzel et al., 2005) and various large and small mammals such as roe deer, wild boar (*Sus scrofa*), badger (*Meles meles*), fox (*Vulpes vulpes*), hare (*Lepus europaeus*), hedgehog (*Erinaceus europaeus*) and different rodent species (Rodentia) can be found on the study site. The estimated roe deer density on the study site is 10 individuals/100ha (= 1 km²).

Collection of samples. Collection of roe deer samples took place from September 2010 to January 2012. All roe deer except one roadkill were professionally hunted and blood, spleen and skin samples were taken. Skin samples were collected from roe deer since May 2011. Blood samples were taken out of the common iliac vein and collected in EDTA tubes. Spleen and skin samples from the ear were taken separate with sterile 6mm KRUUSE biopsy punches (Henry Schein Vet, Hamburg, Germany). If available, the hunter collected between one and a maximum of approximately 20 engorged ticks from each individual since May 2011, even if more ticks were attached to the animals. For practical reasons the hunter only collected adult ticks. In April, May and June 2011 questing ticks were collected with the flagging method. Tick larvae were collected, but not included in the analysis of this study. Spleen, skin and ticks were immediately stored in 15 mL tubes (nerbe plus, Winsen, Germany) with 70 % ethanol at room temperature. Each tick was washed in distilled water and species, stage and gender were identified with a stereo microscope using a standard taxonomic key (Hillyard, 1996). After identification the ticks were separately frozen in a 2 mL Eppendorf tube (Eppendorf, Hamburg, Germany) at -20 °C until DNA extraction.

DNA extraction. DNA was extracted with the automated Maxwell[®] 16 System and the Maxwell[®] 16 LEV Blood DNA Kit (Promega, Mannheim, Germany) from all tissue and blood samples, a maximum of 5 engorged female and 5 engorged male ticks/individual and a maximum of 40 questing ticks of each developmental stage, gender and month. Blood samples were extracted according to the manufacturer's instruction. Tissue (subsamples of spleen and skin samples ~ size of a grain of rice) and ticks (fully engorged female ticks cut lengthwise with sterile scalpel-blades) were treated differently. First, all ticks were shredded with 300 µL sterile phosphate-buffered saline with a 5 mm steel bead in the Tissue Lyser (Qiagen, Hilden, Germany) at 20 beats/second for 5 minutes. Then, tissue and ticks were handled the same way: 300 µL Lysis Buffer and 30 µL Proteinase K Solution were added and samples were incubated over night at 56 °C in a Thermomixer comfort (Eppendorf). All samples were eluted in 60 µL Elution Buffer. DNA concentration was measured spectrophotometrically (Nano Drop[®] ND-1000, PeqLab Erlangen, Germany). Before performing the PCR all samples were diluted up to 1:100 with Elution Buffer depending on primary eluted DNA concentration. DNA concentration was kept less than 240 ng/µL in all samples to ensure that highly concentrated DNA could not inhibit the PCR process and cause a false negative result.

PCR amplification, species identification and sequencing. *A. phagocytophilum* was detected by real time PCR. Blood, spleen and skin samples were screened in the AB-7500 FAST Real Time PCR System (Applied Biosystems[®], Darmstadt, Germany), questing ticks and engorged ticks were screened in the AB-7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems[®]). An assortment of *A. phagocytophilum* positive samples was investigated with a nested PCR targeting the *16S rRNA* gene (primers and cycling conditions Table 1) to detect different variants of *A. phagocytophilum*. *Babesia* spp. and *Rickettsia* spp. were detected with conventional PCRs (primers and cycling conditions Table 1). All conventional and nested PCRs were performed in the Thermocycler Mastercycler[®] gradient (Eppendorf). PCR-Mastermix without the tested DNA, but with PCR-clean water as replacement of the volume of DNA solution as negative control and a positive control were included in every PCR run (positive controls listed in Table 1). The PCR products of the conventional PCRs were analysed by gel electrophoresis on a 2 % agarosegel (Top Vision Agarose; Fermentas, St.Leon-Rot, Germany), dyed with Gel RedTM Nucleid Acid stain, 10,000x in water (Biotium Hayward, USA) using a final Gel RedTM concentration of 1x). Visualization was performed under UV-light (PeqLab). PCR products of *Babesia* spp., *A. phagocytophilum* and *Rickettsia*

spp. were purified using the QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) according to the manufacturer's protocol. Sequencing was performed by Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Germany), for *A. phagocytophilum* with both primers used for the second amplification step in the nested PCR and for *Babesia* spp. and *Rickettsia* spp. with one primer each. Results were analyzed by Chromas Lite[®]. The amplified region of the partial *18S rRNA* gene of *Babesia* spp. includes 2 of the 3 nucleotide differences of the full gene described as specific for *B. divergens* and *B. capreoli* at position 631 and 663 which thus allows the discrimination between the two species with the amplified part in the present study (Malandrin et al., 2010; Silaghi et al., 2011a). The reverse sequences were reversed and complemented with Reverse Complement (http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html) and alignment was performed with ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). Database searches and sequence comparison were done with BLAST tool provided by the National Center for Biotechnology Information (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). All *A. phagocytophilum* sequences were compared with sequences from previous studies by our group (Schorn et al., 2011a; Silaghi et al., 2008a; 2011a; b).

Statistical analysis

Fisher's Exact Test for Count Data (Fisher, 1935) was performed to investigate the difference in prevalence between questing and engorged ticks, the development stages of ticks, males and females (ticks and roe deer), age groups of deer and the independence of pathogens for deer. Exact confidence intervals of the prevalence for deer and subgroups of engorged and questing ticks (CI 95 %) were computed with the Clopper and Pearson method. Exact Binomial Test was used to compare results of blood, spleen and skin samples of deer (Clopper and Pearson, 1934). Statistical analysis was performed with R version 2.15.0 (R Development Core Team, 2012).

Table 1/1: PCR conditions and primers used for detection of *Anaplasma phagocytophilum*, *Babesia* spp. and *Rickettsia* spp.

Pathogen	Target gene	Length of amplicon (bp)	Sample	Primer and probe	Source of positive control (full genomic DNA extracts)	Cycle condition	Reaction volume	Reference
<i>Babesia</i> spp	<i>18S rRNA</i>	411-452	blood, spleen, ticks	BJ1 5'-GTC TTG TAA TTG GAA TGA TGG-3' BN2 5'-TAG TTT ATG GTT AGG ACT ACG-3'	<i>Babesia divergens</i> from naturally infected cattle (Diagnostic laboratory of the institute)	¹⁾ 94°C, 30sec 54°C, 30sec 72°C, 40sec → 40x ²⁾	total volume 50µL ⁵⁾ 5µL template DNA BJ1 1µM BN2 1µM Buffer 1x dNTPs 0.2mM HotStarTaqPlus Polymerase 1.25U	(Casati et al., 2006; Schorn et al., 2011b)
						95°C, 20sec 95°C, 3sec 60°C, 30sec → 40x	total volume 20µL MMX 1x ³⁾ 5µL template DNA ApMsp2f 0.9µM ApMsp2r 0.9µM ApMsp2p 0.2µM	Courtney et al., 2004; Schorn et al., 2011a; Silaghi et al., 2011b)
<i>A. phagocytophilum</i>	<i>msp2</i>	77	ticks	ApMsp2f 5'-ATG GAA GGT AGT GTT GGT TAT GGT ATT-3' ApMsp2r 5'-TTG GTC TTG AAG CGC TCG TA-3' ApMsp2p 5'-TGG TGC CAG GGT TGA GCT TGA GAT TG-3' labeled at 5' with FAM (carboxy-fluorescein) and 3' with TAMRA (carboxyl-tetramethyl-rhodamine)	<i>In vitro</i> cultured <i>Anaplasma phagocytophilum</i> isolate in IDE-8 cells	50°C, 1sec 95°C, 10min 95°C, 15sec 60°C, 1min → 40x 95°C, 15sec 60°C, 1min. 95°C, 30sec 60°C, 15sec	total volume 50µL MMX 1x ⁴⁾ 5µL template DNA ApMsp2f 0.3µM ApMsp2r 0.3µM	
	<i>16S rRNA</i>	497	blood, spleen, ticks	1. Amplifikation: ge3a 5'-CAC ATG CAA GTC GAA CGG ATT ATT C-3' ge10r 5'-TTC CGT TAA GAA GGA TCT AAT CTC C-3' 2. Amplifikation: ge9f 5'-AAC GGA TTA TTC TTT ATA GCT TGC T-3' ge2 5'-GGC AGT ATT AAA AGC AGC TCC AGG-3'		¹⁾ 94°C, 30sec 55°C, 30sec 72°C, 1min 1. Amplifikation → 40x 2. Amplifikation → 25x ²⁾	total volume 50µL ⁵⁾ 1. Amplifikation 5µL template DNA ge3a 1µM ge10r 1µM 2. Amplifikation 1µL PCR product (Amplifikation 1) ge9f 1µM ge2 1µM Buffer 1x MgCl2 0.5mM dNTPs 0.2mM HotStar TaqPlus Polymerase 2.5U	(Massung et al., 1998; Silaghi et al., 2011f)

Table 1/2: PCR conditions and primers used for detection of *Anaplasma phagocytophilum*, *Babesia* spp. and *Rickettsia* spp.

Pathogen	Target gene	Length of amplicon (bp)	Sample	Primer and probe	Source of positive control (full genomic DNA extracts)	Cycle condition	Reaction volume	Reference
<i>Rickettsia</i> spp.	<i>gltA</i> Citrat-Synthase Gen	381	skin, spleen, ticks	RpCs877p 5'-GGG GGC CTG CTC ACG GCG G-3' RpCs1258n 5'-ATT GCA AAA AGT ACA GTG AAC A-3'	Naturally infected ticks from previous own studies	94°C, 3min	total volume 50µL ⁶⁾ 5µL template DNA	Bertolotti et al., 2006; Regnery et al., 1991; Schorn et al., 2011b; Silaghi et al., 2008b)
						95°C, 20sec 48°C, 30sec 60°C, 2min → 35x 72°C, 7min	RpCs877p 0.5µM RpCs1258n 0.5µM Buffer 1x MgCl2 1.5mM dNTPs 0.2mM Expand High Fidelity ^{plus} TaqPolymerase 2.5U	

- 1) Initial activation step: 95°C 5min (Qiagen, Hilden, Germany)
- 2) Final extension: 72°C 5min (Qiagen, Hilden, Germany)
- 3) Taq Man fast Universal PCR Mastermix 2x (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany)
- 4) SYBR Green PCR Master Mix 2x (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany)
- 5) HotStarTaqPlus DNA Polymerase Kit (Qiagen, Hilden, Germany)
- 6) Expand High Fidelity plus PCR System (Roche, Mannheim, Germany)

Results

A total of 95 roe deer of different gender (52 females, 43 males) and age [(individuals/age in years: 27/<1; 48/1-2; 20>2) judged by the hunter] were screened for *A. phagocytophilum*, *Babesia* spp. and *Rickettsia* spp. and 95 spleen, 86 blood and 56 skin samples were available (Table 2). A total of 557 adult ticks (426 females, 131 males) from 44 roe deer (range 1 to 20 ticks collected/individual) were collected from the animals. The numbers of immature ticks on these deer are unknown. The number of adult ticks collected is not in accordance with the true number of ticks present on the investigated roe deer. Altogether 331 ticks from 44 roe deer [206 female, 125 male, with a maximum of 5 engorged female and 5 engorged male ticks/individual] were investigated by molecular methods (Table 3). Additionally 970 host seeking ticks were flagged in April, May and June 2011 of which 79 were identified as adults (33 females, 46 males) and 891 as nymphs. A total of 199 questing ticks (79 adults, 120 nymphs, with a maximum of 40 questing ticks of each developmental stage, gender and month) were investigated by molecular methods (Table 3). All ticks were identified as *I. ricinus*.

***Babesia* spp.**

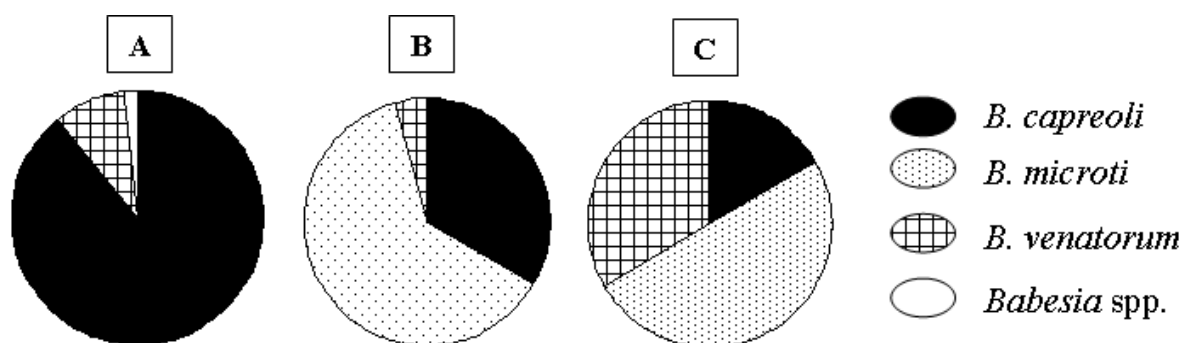
In summary, 89.5 % [85/95 (95 % CI 81.5-94.8)] of either blood or spleen samples from roe deer were positive for DNA of *Babesia* spp. (Table 2). Similar percentage of deer blood samples [77.9 % (67/86)] and deer spleen samples [75.6 % (65/86)] were positive. The difference of prevalence in both materials was statistically not significant ($p>0.5$). There was no association of prevalence of *Babesia* spp. and age or gender of the animals ($p>0.05$). Furthermore 7.3 % of engorged adult ticks [24/331; females: 7.3 % (15/206) (95 % CI 4.1-11.7); males: 7.2 % (9/125) (95 % CI 3.3-13.2)] from 17 individual roe deer showed a positive result in the PCR (Table 3). Of those roe deer individuals, 15 out of 17 were positive for *Babesia* spp. in blood and/or spleen, one out of 17 was negative for *Babesia* spp. in both blood and spleen (engorged tick showed *B. microti* sequence) and 1 out of 17 was negative for *Babesia* spp. in spleen (from this roe deer only the spleen sample and no blood sample was available, the engorged tick collected from this individual showed a *B. capreoli* sequence). All other roe deer were positive at least in one sample (blood or spleen). Furthermore, 2.5 % of investigated questing adult ticks [2/79; females: 6.1 % (2/33) (95 % CI 0.7-20.2); males: 0 % (0/46) (95 % CI 0.0-7.7)] and 3.3 % of questing nymphs [4/120 (95 % CI 0.9-8.3)] were infected with *Babesia* spp. (Table 3). The difference of *Babesia* spp.

prevalence in questing adult ticks and nymphs and between questing and engorged adult ticks was statistically not significant ($p > 0.05$).

Altogether, 56 *Babesia* spp. positive blood ($n=30$) and spleen ($n=26$) samples from different roe deer individuals were sequenced. Sequence analysis revealed 89.3 % of samples [50/56 (29 blood, 21 spleen)] with 100 % identity to a *B. capreoli* sequence from roe deer in France (GenBank accession no. FJ944828) and 8.9 % [5/56 (1 blood, 4 spleen)] samples were 100 % identical to *B. venatorum* sequences found in roe deer, reindeer (*Rangifer tarandus*) and *I. ricinus* ticks (GenBank accession nos. JF922093, GQ888709). For one of the 56 samples (spleen), 99 % similarity to *B. capreoli*, *B. divergens* and *Babesia divergens*-like sequences was detected, but the species could not be further identified (GenBank accession nos. FJ944828, AY572456, AY904043). Sequencing of engorged ticks showed in 62.5 % (15/24) of *Babesia* spp. positive samples 100 % identity to the human zoonotic strain Jena/Germany (GenBank accession nos. EF413181). Another 33.3 % (8/24) were 100 % homologous to *B. capreoli* and 4.2 % (1/24) to *B. venatorum*. Sequence analysis of questing ticks revealed three of the six samples with 100 % identity to *B. microti* strain Jena/Germany, one was 100 % identical to *B. capreoli* and two were 100 % identical to *B. venatorum*. Figure 1 shows the differences in the prevalence of *B. capreoli*, *B. microti*, *B. venatorum* and *Babesia* spp. in roe deer, engorged ticks and questing ticks.

Sequences obtained in this study were deposited in GenBank under the following accession nos.: *B. capreoli*: [GenBank: JX627350, JX627353, JX627354, JX627358], *B. venatorum*: [GenBank: JX627351, JX627352, JX627355, JX627357], *B. microti*: [GenBank: JX627356, JX627359]

Figure 1. Prevalence of *Babesia* (*B.*) *capreoli*, *B. microti*, *B. venatorum* and *Babesia* spp. in A) roe deer, B) engorged ticks from roe deer and C) questing ticks from a single forest site in Bavaria, Germany



Anaplasma phagocytophilum

Altogether, 98.9 % [94/95 (95 % CI 94.3-100)] of roe deer were positive either in spleen or blood (Table 2). A similar percentage of roe deer individuals were positive in spleen [98.8 % (85/86)] and in blood samples [97.7 % (84/86)]. The difference of prevalence in both samples was statistically not significant ($p>0.05$). DNA of *A. phagocytophilum* was detected in 71.4 % (40/56) of skin samples (Table 2) which was statistically significantly less than in blood or spleen ($p<0.05$). There was no association of prevalence of *A. phagocytophilum* with age or gender of roe deer ($p>0.05$). A total of 86.1 % of ticks collected from roe deer [285/331; female: 99.0 % (204/206) (95 % CI 96.5-99.9); male: 64.8 % (81/125) (95 % CI 55.8-73.1)] were *A. phagocytophilum* positive (Table 3). Furthermore 8.9 % of investigated questing adult ticks [7/79; females 6.1 % (2/33) (95 % CI 0.7-20.2); males: 10.9 % (5/46) (95 % CI 3.6-23.6)] and 0.8 % of questing nymphs [1/120 (95 % CI 0.02-4.6)] were positive for *A. phagocytophilum* (Table 3). Questing adult ticks were significantly more often positive for *A. phagocytophilum* than questing nymphs ($p<0.05$). Engorged adult ticks were significantly more often positive for *A. phagocytophilum* than questing adult ticks ($p<0.05$).

A total of 16 roe deer samples (10 blood and 6 spleen samples), 16 engorged ticks and 4 questing tick samples which were positive for *A. phagocytophilum*, were further investigated with the nested PCR amplifying the partial *16S rRNA* gene and sequenced afterwards. Alignment of 497 base pairs of the obtained partial *16S rRNA* gene sequences revealed 8 variants with 99 to 100 % identity to each other and to sequences previously deposited in the GenBank database (GenBank accession nos. and differences in 6 nucleotide positions: Table 4). Not all *16S rRNA* gene sequences which were found in engorged ticks, apart from variant 'W' and 'N', matched 100 % with the sequence variant found in the respective roe deer individual.

Sequences obtained in this study were deposited in GenBank under the following accession nos.: *A. phagocytophilum* variant I: [GenBank: JX627360, JX627366, JX627373], variant N: [GenBank: JX627361, JX627374], variant V: [GenBank: JX627362, JX627375], variant W: [GenBank: JX627363, JX627376], variant X: [GenBank: JX627364, JX627367, JX627371, JX627377], variant Y: [GenBank: JX627365, JX627368, JX627372, JX627378], variant B: [GenBank: JX627369], variant O: [GenBank: JX627370]

***Rickettsia* spp.**

Rickettsia spp. were not detected in spleen or skin samples of roe deer (Table 2). On the other hand, 16.6 % of engorged adult ticks [55/331; females: 18.4 % (38/206) (95 % CI 13.4-24.4); males: 13.6 % (17/125) (95 % CI 8.1-20.9)] as well as 13.9 % of investigated questing adult ticks [11/79; females: 18.2 % (6/33) (95 % CI 7.0-35.5); males: 10.9 % (5/46) (95 % CI 3.6-23.6)] and 17.5 % of questing nymphs [21/120 (95 % CI 11.2-25.5)] were positive for *Rickettsia* spp. (Table 3). The difference of *Rickettsia* spp. prevalence in questing adult ticks and nymphs and between questing and engorged adult ticks was statistically not significant ($p>0.05$).

Altogether 23 *Rickettsia* spp. positive samples (15/55 from engorged ticks, 8/32 from questing ticks) were sequenced. All samples were 100 % identical to *R. helvetica* (GenBank accession nos. JQ669952, HM371185).

Sequences obtained in this study were deposited in GenBank under the following accession nos.: *R. helvetica*: [GenBank: JX627379, JX627380]

Coinfections

Coinfections were found in blood or spleen samples of individual roe deer:

Babesia spp./*A. phagocytophilum*: 88.4 % (84/95) (double infections of *A. phagocytophilum*/*B. capreoli* and of *A. phagocytophilum*/*B. venatorum* were detected in roe deer);

Double infections in engorged and in questing ticks are shown in Table 3. Triple infections were not detected in questing ticks, but the following triple infections were detected in engorged ticks:

A. phagocytophilum/*Babesia* spp./*Rickettsia* spp.: 1.5 % (5/331) [*A. phagocytophilum*/*B. capreoli*/*Rickettsia* spp.: 0.9 % (3/331), *A. phagocytophilum*/*B. microti*/*Rickettsia* spp.: 0.3 % (1/331), *A. phagocytophilum*/*B. venatorum*/*Rickettsia* spp.: 0.3 % (1/331)].

Table 2: DNA detection of *Babesia* spp., *Anaplasma phagocytophilum* and *Rickettsia* spp. in blood, spleen (obtained from September 2010-January 2012) and skin samples (obtained from May 2011-January 2012) of roe deer and comparative results of different material

Species	Material	No. total	No. positive (%) ¹⁾					
			<i>Babesia</i> spp. ²⁾		<i>Anaplasma phagocytophilum</i>		<i>Rickettsia</i> spp.	
Roe deer	Blood <u>OR</u> spleen ³⁾	95	85	(89.5)	94	(98.9)	na	na
	Blood	86	67	(77.9)	84	(97.7)	nd	nd
	Spleen	95	71	(74.7)	94	(98.9)	0	(0.0)
	Blood <u>AND</u> spleen	86	53	(61.6)	84	(97.7)	na	na
	Blood only	86	14	(16.3)	0	(0.0)	na	na
	Spleen only	95	18	(18.9)	10	(10.5)	na	na
	Skin	56	nd	nd	40	(71.4)	0	(0.0)

1) na=not applicable, nd=not done

2) 50x *B. capreoli*, 5x *B. venatorum*, 1x *B. capreoli/B. divergens/Babesia* spp., 29x *Babesia* spp. (not all positive samples were sequenced) (distribution of species shown in Fig. 1)

3) no. of individuals positive in at least one of the materials blood or spleen

Table 3: Single and double DNA detection of *Babesia* spp., *Anaplasma phagocytophilum* and *Rickettsia* spp. in engorged (collected from roe deer) and questing *Ixodes ricinus* ticks (triple infections are shown in the text of the manuscript)

Species	Material	No. total	No. positive (%)											
			<i>Babesia</i> spp. ¹⁾		<i>Anaplasma phagocytophilum</i>		<i>Rickettsia</i> spp. ²⁾		<i>Babesia</i> spp./ <i>Anaplasma phagocytophilum</i> ³⁾		<i>Babesia</i> spp./ <i>Rickettsia</i> spp. ⁴⁾		<i>Anaplasma phagocytophilum</i> / <i>Rickettsia</i> spp. ⁵⁾	
Engorged ticks	Adults	331	24	(7.3)	285	(86.1)	55	(16.6)	21	(6.3)	5	(1.5)	50	(15.1)
	Females	206	15	(7.3)	204	(99.0)	38	(18.4)	15	(7.3)	4	(1.9)	37	(18.0)
	Males	125	9	(7.2)	81	(64.8)	17	(13.6)	6	(4.8)	1	(0.8)	13	(10.4)
Questing ticks	Adults	79	2	(2.5)	7	(8.9)	11	(13.9)	1	(1.3)	1	(1.3)	2	(2.5)
	Females	33	2	(6.1)	2	(6.1)	6	(18.2)	1	(3.0)	1	(3.0)	0	(0.0)
	Males	46	0	(0)	5	(10.9)	5	(10.9)	0	(0.0)	0	(0.0)	2	(4.3)
	Nymphs	120	4	(3.3)	1	(0.8)	21	(17.5)	0	(0.0)	2	(1.7)	1	(0.8)

1) engorged ticks: 8x *B. capreoli*, 1x *B. venatorum*, 15x *B. microti*; questing ticks: 1x *B. capreoli*, 2x *B. venatorum*, 3x *B. microti* (distribution of species shown in Fig. 1)

2) engorged ticks: 15x *R. helvetica*, 40x *Rickettsia* spp. (not all positive samples were sequenced); questing ticks: 8x *R. helvetica*, 24x *Rickettsia* spp. (not all positive samples were sequenced)

3) engorged ticks: 8x *B. capreoli/A. phagocytophilum*, 1x *B. venatorum/A. phagocytophilum*, 12x *B. microti/A. phagocytophilum*; questing ticks: 1x *B. microti/A. phagocytophilum*

4) engorged ticks: 3x *B. capreoli/Rickettsia* spp., 1x *B. venatorum/Rickettsia* spp., 1x *B. microti/Rickettsia* spp.; questing ticks: 2x *B. microti/Rickettsia* spp., 1x *B. venatorum/Rickettsia* spp.

5) engorged ticks: 14x *A. phagocytophilum/R. helvetica*, 36x *A. phagocytophilum/Rickettsia* spp.; questing ticks: 1x *A. phagocytophilum/R. helvetica*, 2x *A. phagocytophilum/Rickettsia* spp.

Table 4: single nucleotide substitutions in the 1433-bp sequence of the *Anaplasma phagocytophilum* 16S rRNA gene in 36 samples of roe deer, engorged ticks and questing ticks compared with GenBank sequences

Sequence variant ¹⁾	Host species in this study				Hosts found in other studies (GenBank accession no) ²⁾	Nucleotide position ³⁾					
	Total number	Roe deer	Engorged ticks	Questing ticks		76	78	80	84	175	405
X	13	7	5	1	<i>Ixodes ricinus</i> (HQ629923), <i>Ixodes scapularis</i> , (AF311343), goat (<i>Capra aegagrus hircus</i>) (FJ538288), roe deer (<i>Capreolus capreolus</i>) (HM480381)	G	A	A	A	C	A
Y	8	2	5	1	<i>Ixodes ricinus</i> (JN181069), cotton rat (<i>Sigmodon hispidus</i>) (JQ063025), goat (FJ538289), mouflon (<i>Ovis musimon</i>) (FJ812409), roe deer (HM480385)	G	A	A	G	C	A
I	6	4	2	0	<i>Ixodes ricinus</i> (FJ788513), roe deer (AF384214)	G	A	A	A	A	A
V	3	1	2	0	<i>Ixodes ricinus</i> (FJ788512), dog (<i>Canis lupus familiaris</i>) (JN656381), European hedgehog (<i>Erinaceus europaeus</i>) (JN571162)	A	A	G	A	C	A
W	2	1	1	0	<i>Ixodes ricinus</i> (JN181071), <i>Ixodes persulcatus</i> (HM366582), northern red-backed vole (<i>Myodes rutilus</i>) (HQ630622), bank vole (<i>Myodes glareolus</i>) (AY094353), common shrew (<i>Sorex araneus</i>) (HQ630623), European hedgehog (JN571163), coyote (<i>Canis latrans</i>) (AF170728), dog (AY741098), horse (<i>Equus ferus caballus</i>) (AF172167), cattle (<i>Bos taurus</i>) (JQ026308), llama (<i>Lama glama</i>) (AF241532), mouflon (EU839851), chamois (<i>Rupicapra rupicapra</i>) (FJ812399), red deer (<i>Cervus elaphus</i>) (GQ428331), sheep (<i>Ovis aries</i>) (GQ428333), wild boar (<i>Sus scrofa</i>) (GU391313), human (<i>Homo sapiens</i>) (AF093789)	A	A	A	A	C	A
N	2	1	1	0	N.M. ⁴⁾	G	A	A	A	C	G
O	1	0	0	1	Roe deer (GU236538)	G	G	A	G	C	A
B	1	0	0	1	<i>Ixodes ricinus</i> (HQ629917), <i>Ixodes ovatus</i> (AY969015), <i>Haemaphysalis longicornis</i> (GU064899), vulture (<i>Falconiformes</i>) (JN217095), cottontail rabbit (<i>Sylvilagus floridanus</i>) (AY144728), white-footed mouse (<i>Peromyscus leucopus</i>) (U72878), European hedgehog (JN571159), dog (FJ829787), horse (JF893938), red deer (EU839850), roe deer (EU839848), human (AY886761, U02521)	A	A	A	G	C	A
					<i>Anaplasma phagocytophilum</i> HZ complete genome (NC_007797)	A	A	A	G	C	A

1) no official nomenclature but has been used in previous studies (Schorn et al., 2011a; Silaghi et al., 2011b)

2) list not exhaustive

3) *Anaplasma phagocytophilum* HZ complete genome (GenBank accession no. NC_007797) was used as reference strain: Nucleotide positions indicate the relative position to the 1433 bp of the *rrsA* 16S ribosomal RNA gene [Gene ID: 3930754]

4) no match with sequences in GenBank

Discussion

Previous studies have suggested that the tick density in forests and the occurrence of tick-borne pathogens are influenced by the abundance and distribution of potential reservoir hosts such as roe deer (Jensen et al., 2000; Rizzoli et al., 2009) which serves as one of the main feeding hosts for *I. ricinus* (Carpi et al., 2008). Roe deer inhabits several kinds of tick-infested habitats and is known to migrate more than 100 km carrying a highly variable tick burden. This extent of the migration area facilitates the spreading of ticks (Vor et al., 2010) and therefore potentially also of tick-borne pathogens. In this study the prevalence of DNA of *Babesia* spp., *A. phagocytophilum* and *Rickettsia* spp. was investigated in roe deer as well as in engorged ticks collected from these animals and in questing ticks from a single forest site. The *Babesia* spp. prevalence found in roe deer in this study was higher than the average prevalence of DNA detection of *Babesia* spp. in roe deer samples in different European countries which ranges from 26.1 % to 76.5% (Duh et al., 2005; Hoby et al., 2009; Silaghi et al., 2011a; Tampieri et al., 2008). When comparing the *Babesia* spp. prevalence detected in this study with prevalences described in previous studies, different detection methods as well as variations in the composition of *Babesia* species must be kept in mind for potential prevalence variations. The high prevalence with *B. capreoli* in the present study supports the role of roe deer as reservoir host for this *Babesia* species.

We detected DNA of *Babesia* spp. in 7.3 % of engorged ticks from roe deer. Whereas a total of 89.5 % of roe deer were positive for *Babesia* spp. (of which 90 % for *B. capreoli*), only 2.4 % of all engorged ticks harboured *B. capreoli* DNA and in questing ticks the prevalence for *B. capreoli* was as low as 0.5 % indicating persistence of infection in roe deer. Surprisingly over 60 % (15/24) of the *Babesia* spp. PCR positive engorged ticks showed 100 % homology with *B. microti* strain Jena/Germany, a *Babesia* species mainly associated with rodents (Beck et al., 2011; Duh et al., 2003; Hildebrandt et al., 2007; Silaghi et al., 2012b; Zamoto et al., 2004). Ticks were most probably infected with *B. microti* while feeding as larvae or nymphs on rodents, before finding a roe deer host in the adult stage. Altogether, we found 3% positivity in investigated questing ticks collected in the ‘Angelberger Forst’ for DNA of *Babesia* spp. (*B. capreoli*, *B. venatorum*, *B. microti*) in adults and nymphs. This *Babesia* spp. prevalence is higher than 0.4 % to 0.7 % found in a previous study in questing *I. ricinus* ticks in city parks in Southern Germany (Schorn et al., 2011b) but lower than 5 % to 10.7 % in forest and urban areas in Central and Eastern Germany (Franke et al., 2010; Hildebrandt et al., 2011; Silaghi et al. 2012b). Differences are most likely due to both *Babesia* and host species composition.

A high prevalence of DNA of *A. phagocytophilum* was detected in blood and spleen, but also in skin samples. During the tick-bite a feeding lesion is created and polymorphonuclear neutrophil (PMN) leukocytes infiltrate the area (Herron et al., 2005; Tatchell and Moorhouse, 1970). *A. phagocytophilum* has a tropism for neutrophils (Carlyon and Fikrig, 2003; Chen et al., 1994) and was previously also found in PMNs and macrophages in skin biopsies of lambs (Granquist et al., 2010). Studies in the past have shown that the average prevalence of DNA detection of *A. phagocytophilum* in roe deer ranges from 18.4 % to 94.0 % in several European countries (Liz et al., 2002; Oporto et al., 2003; Petrovec et al., 2003; Polin et al., 2004; Scharf et al., 2011; Silaghi et al., 2011a; Skarphéðinsson et al., 2005; Stefanidesova et al., 2008). The high prevalence in roe deer detected in the present study confirms the high prevalence found previously in this geographic area (Silaghi et al., 2011d). The biological reasons for the exceptionally high prevalence with *A. phagocytophilum* in roe deer from this study site remain to be elucidated. However, the high prevalence indicates the role of this wild ungulate as a natural reservoir for this pathogen. In the present study, the prevalence in questing ticks from the natural forest area equals the average prevalence detected in studies in Germany over more than a decade in >20.000 ticks (reviewed in Silaghi et al., 2012b), but was lower compared to the prevalence of *I. ricinus* from city parks in Germany (Schorn et al., 2011a).

We detected different partial *16S rRNA* gene variants of *A. phagocytophilum* in this study. It has been shown previously that a basic distinction into variants associated with wild ruminants, domestic animals or both groups can be achieved with this approach (Silaghi et al., 2011b; 2011e; 2012a). The majority of sequences in the present study were variants ‘X’ (n=13) and ‘Y’ (n=8), which seem mainly associated to wild cervid species such as roe deer (Silaghi et al., 2011b; 2011f). Variants ‘I’, ‘V’ and ‘O’ which have 100 % identity to GenBank accession nos. AF384214, AY281785 and GU236538 had also been found previously in roe deer (Liz et al., 2002; Scharf et al., 2011). Variant ‘W’ was found in one roe deer individual in this study. It had been detected in previous studies in several mammalian species such as small mammals (Rar et al., 2011), sheep (*Ovis aries*), bison (*Bison bonasus*), cattle (*Bos taurus*), red deer (*Cervus elaphus*) (Scharf et al., 2011), chamois (*Rupicapra rupicapra*) and moufflon (*Ovis orientalis musimon*) (Silaghi et al., 2011b) and is known to cause tick-borne fever in cattle (Nieder et al., 2012) and sheep (Stuen et al., 2011).

The prevalence in both engorged and questing adult ticks for *Rickettsia* spp. was comparable (16.6% and 13.9%, respectively) and it was higher, for example, than the infection rate of 6.4 % to 7.7 % (*R. helvetica*, *R. monacensis*) described in a previous study in city parks in

Southern Germany (Schorn et al., 2011b). Interestingly, a forest site which is geographically close to the investigated area in the present study, showed a comparably high prevalence in a previous investigation [site W in (Silaghi et al., 2008b)], indicating potentially higher prevalence rates with *Rickettsia* spp. in *I. ricinus* in forest areas. However, DNA of *Rickettsia* spp. was not detected in any of the investigated roe deer in the present study and thus, no evidence that large wild mammals such as roe deer play a definitive role in the epidemiology of *R. helvetica* was provided. It was also indicated in previous studies that roe deer do not seem to be competent reservoir hosts for *Rickettsia helvetica* (Skarphedinsson et al., 2005; Stańczak et al., 2009; Stefanidesova et al., 2008).

Several co-infections were detected in animals and ticks. We found that 88.4 % (84/95) of roe deer were positive for *Babesia* spp. and *A. phagocytophilum*, which is comparable to co-infection rate of 85.7 % found in wild ungulates in Austria (Silaghi et al., 2011a). It is likely that, in the vertebrate hosts, interactions between different species of pathogens may have effects on the host organism. They might lead to increased susceptibility to other microparasites and consequently to co-infection in their hosts (Telfer et al., 2010). Also the duration of infection due to resource competition and host morbidity may influence and be influenced by a current and previous infection (Telfer et al., 2008). Infection with *A. phagocytophilum* can increase or decrease host susceptibility to other infections by immunomodulatory effects (Telfer et al., 2010). Additionally *B. microti* infection in field voles increases the risk for infection with *A. phagocytophilum* (Telfer et al., 2010). We suggest that similar increasing or decreasing effects on host susceptibility induced by *B. capreoli* or *A. phagocytophilum* to other infections exist in roe deer. The presence of further micro- and macroparasites which were not analysed in the roe deer community in the present study and consequently, any interactions of those unknown parasites with the investigated pathogens cannot be excluded. Communities of microparasites in wild animals seem to interact in a complex, but yet largely unknown way that needs to be further systematically investigated in order to understand the epidemiological cycles and multiple tick-host-parasite interactions influencing them. Detection of co-infection in questing and engorged ticks showed an increase of triple positivity for DNA of *Babesia* spp., *A. phagocytophilum* and *Rickettsia* spp. in engorged compared to questing ticks. An individual tick may have become infected with pathogens already in the larval and nymphal stages before it takes the next blood meal on e.g. a roe deer host. During this blood meal the adult ticks can receive further pathogens from the host. This seems the most likely reason for the increased co-infection of engorged ticks in our study and the high infection rate of *A. phagocytophilum* in engorged

ticks on roe deer. Additionally co-feeding as a way of pathogen-transmission to uninfected ticks is known for example for *Borrelia* spp. (Gern and Rais, 1996; Randolph et al., 1996; Rizzoli et al., 2011; Tsao, 2009). Furthermore, pathogens may occur in relatively low numbers in questing ticks, but may be activated through the tick saliva and proliferate which has for example been shown for tick-borne encephalitis virus (Belova et al., 2012). All these factors might lead to the increased co-infections in engorged ticks.

In summary, the results of this study support the role of roe deer as reservoir hosts for *B. capreoli* and *A. phagocytophilum*, but evidence for the role of roe deer in the life cycle of *R. helvetica* was not found.

Acknowledgments

The authors are most grateful to Claudia Thiel, Tim Tiedemann, Andrea Mihalkov and Ute Maurer for excellent technical assistance. Thanks to Melanie Kauffmann for providing the roe deer samples of 2010. This study was partially funded by EU grant FP7-261504 EDENext and is catalogued by the EDENext Steering Committee as EDENext076 (<http://www.edenext.eu/>). The contents of this publication are the sole responsibility of the authors and do not necessarily reflect the views of the European Commission.

References

- Beck R, Vojta L, Curković S, Mrljak V, Margaletić J, Habrun B, 2011, Molecular survey of *Babesia microti* in wild rodents in central Croatia. Vector Borne Zoonotic Dis 11, 81-83.
- Belova, OA, Burenkova L A, Karganova, G.G, 2012, Different tick-borne encephalitis virus (TBEV) prevalences in unfed versus partially engorged ixodid ticks--evidence of virus replication and changes in tick behavior. Ticks Tick Borne Dis 3(4): 240-246.
- Bertolotti L, Tomassone L, Tramuta C, Grego E, Amore G, Ambroggi C, Nebbia P, Mannelli A, 2006, *Borrelia lusitaniae* and spotted fever group rickettsiae in *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) in Tuscany, central Italy. J Med Entomol 43, 159-165.

Bezzel E, Geiersberger I, Lossow Gv, Pfeifer R, 2005, Brutvögel in Bayern. Verbreitung 1996 bis 1999. Stuttgart: Verlag Eugen Ulmer 560 S.

Bonnet S, Jouglin M, L'Hostis M, Chauvin A, 2007, *Babesia* sp. EU1 from roe deer and transmission within *Ixodes ricinus*. Emerg Infect Dis 13, 1208-1210.

Carlyon JA, Fikrig E, 2003, Invasion and survival strategies of *Anaplasma phagocytophilum*. Cell Microbiol 5, 743-754.

Carpi G, Cagnacci F, Neteler M, Rizzoli A, 2008, Tick infestation on roe deer in relation to geographic and remotely sensed climatic variables in a tick-borne encephalitis endemic area. Epidemiol Infect 136, 1416-1424.

Casati S, Sager H, Gern L, Piffaretti JC, 2006, Presence of potentially pathogenic *Babesia* sp. for human in *Ixodes ricinus* in Switzerland. Ann Agric Environ Med 13, 65-70.

Chen SM, Dumler JS, Bakken JS, Walker DH, 1994, Identification of a granulocytotropic *Ehrlichia* species as the etiologic agent of human disease. J Clin Microbiol 32, 589-595.

Clopper CJ, Pearson ES, 1934, The use of confidence or fiducial limits illustrated in the case of the binomial. Biometrika 26, 404-413.

Courtney JW, Kostelnik LM, Zeidner NS, Massung RF, 2004, Multiplex real-time PCR for detection of *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi*. J Clin Microbiol 42, 3164-3168.

Dobler G, Wölfel R, 2009, Typhus and other rickettsioses: emerging infections in Germany. Dtsch Arztebl Int 106, 348-354.

Duh D, Petrovec M, Bidovec A, Avsic-Zupanc T, 2005, Cervids as Babesia hosts, Slovenia. Emerg Infect Dis 11, 1121-1123.

Duh D, Petrovec M, Trilar T, Avsic-Zupanc T, 2003, The molecular evidence of *Babesia microti* infection in small mammals collected in Slovenia. Parasitology 126, 113-117.

Fingerle V, Goodman JL, Johnson RC, Kurtti TJ, Munderloh UG, Wilske B, 1997, Human granulocytic ehrlichiosis in southern Germany: increased seroprevalence in high-risk groups. J Clin Microbiol 35, 3244-3247.

Fisher RA, 1935, The logic of inductive inference. Journal of the Royal Statistical Society Series A 98, 39-54.

Forstdirektion Oberbayern-Schwaben, 2004, Managementplan zum FFH-Gebiet 7829-301 "Angelberger Forst".

Franke J, Fritsch J, Tomaso H, Straube E, Dorn W, Hildebrandt A, 2010, Coexistence of pathogens in host-seeking and feeding ticks within a single natural habitat in Central Germany. Appl Environ Microbiol 76, 6829-6836.

Gern L, Rais O, 1996, Efficient transmission of *Borrelia burgdorferi* between cofeeding *Ixodes ricinus* ticks (Acari: Ixodidae). J Med Entomol 33, 189-192.

Granquist EG, Aleksandersen M, Bergström K, Dumler SJ, Torsteinbø WO, Stuen S, 2010, A morphological and molecular study of *Anaplasma phagocytophilum* transmission events at the time of *Ixodes ricinus* tick bite. Acta Vet Scand 52, 43.

Häselbarth K, Tenter AM, Brade V, Krieger G, Hunfeld KP, 2007, First case of human babesiosis in Germany - Clinical presentation and molecular characterisation of the pathogen. *Int J Med Microbiol* 297, 197-204.

Heikkilä HM, Bondarenko A, Mihalkov A, Pfister K, Spillmann T, 2010, *Anaplasma phagocytophilum* infection in a domestic cat in Finland: Case report. *Acta Vet Scand* 52, 62.

Herron MJ, Ericson ME, Kurtti TJ, Munderloh UG, 2005, The interactions of *Anaplasma phagocytophilum*, endothelial cells, and human neutrophils. *Ann N Y Acad Sci* 1063, 374-382.

Herwaldt BL, Cacciò S, Gherlinzoni F, Aspöck H, Slemenda SB, Piccaluga P, Martinelli G, Edelhofer R, Hollenstein U, Poletti G, Pampiglione S, Löschenberger K, Tura S, Pieniazek NJ, 2003, Molecular characterization of a non-*Babesia divergens* organism causing zoonotic babesiosis in Europe. *Emerg Infect Dis* 9, 942-948.

Heyman P., Cochez C., Hofhuis A., van der Giessen J., Sprong H., Porter S.R., Losson B., Saegerman C., Donoso-Mantke O., Niedrig M., Papa A., 2010, A clear and present danger: tick-borne diseases in Europe. *Expert Rev Anti Infect Ther* 8, 33-50.

Hildebrandt A, Franke J, Schmoock G, Pauliks K, Krämer A, Straube E, 2011, Diversity and coexistence of tick-borne pathogens in central Germany. *J Med Entomol* 48, 651-655.

Hildebrandt A, Hunfeld KP, Baier M, Krumbholz A, Sachse S, Lorenzen T, Kiehntopf M, Fricke HJ, Straube E, 2007, First confirmed autochthonous case of human *Babesia microti* infection in Europe. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 26, 595-601.

Hillyard PD, 1996, Ticks of North-West Europe, Synopses of the British Fauna No.52. The Linnean Society of London, London.

Hoby S, Mathis A, Doherr MG, Robert N, Ryser-Degiorgis MP, 2009, *Babesia capreoli* infections in alpine chamois (*Rupicapra r. Rupicapra*), roe deer (*Capreolus c. Capreolus*) and red deer (*Cervus elaphus*) from Switzerland. J Wildl Dis 45, 748-753.

Jensen PM, Hansen H, Frandsen F, 2000, Spatial risk assessment for Lyme borreliosis in Denmark. Scand J Infect Dis 32, 545-550.

Kohn B, Silaghi C, Galke D, Arndt G, Pfister K, 2011, Infections with *Anaplasma phagocytophilum* in dogs in Germany. Res Vet Sci 91, 71-76.

Liz JS, Sumner JW, Pfister K, Brossard M, 2002, PCR detection and serological evidence of granulocytic ehrlichial infection in roe deer (*Capreolus capreolus*) and chamois (*Rupicapra rupicapra*). J Clin Microbiol 40, 892-897.

Malandrin L, Jouglin M, Sun Y, Brisseau N, Chauvin A, 2010, Redescription of *Babesia capreoli* (Enigk and Friedhoff, 1962) from roe deer (*Capreolus capreolus*): isolation, cultivation, host specificity, molecular characterisation and differentiation from *Babesia divergens*. Int J Parasitol 40, 277-284.

Massung RF, Slater K, Owens JH, Nicholson WL, Mather TN, Solberg VB, Olson JG, 1998, Nested PCR assay for detection of granulocytic ehrlichiae. J Clin Microbiol 36, 1090-1095.

Nieder M, Silaghi C, Hamel D, Pfister K, Schmäsckke R, Pfeffer M, 2012, Tick-borne fever caused by *Anaplasma phagocytophilum* in Germany. First laboratory confirmed case in a dairy cattle herd. Tierarztl Prax Ausg G Grosstiere Nutztiere 40, 101-106.

Oporto B, Gil H, Barral M, Hurtado A, Juste RA, Garcia-Perez AL, 2003, A survey on *Anaplasma phagocytophila* in wild small mammals and roe deer (*Capreolus capreolus*) in Northern Spain. Ann N Y Acad Sci 990, 98-102.

Petrovec M, Lotric Furlan S, Zupanc TA, Strle F, Brouqui P, Roux V, Dumler JS, 1997, Human disease in Europe caused by a granulocytic *Ehrlichia* species. J Clin Microbiol 35, 1556-1559.

Petrovec M, Sixl W, Schweiger R, Mikulasek S, Elke L, Wüst G, Marth E, Strasek K, Stünzner D, Avsic-Zupanc T, 2003, Infections of wild animals with *Anaplasma phagocytophila* in Austria and the Czech Republic. Ann N Y Acad Sci 990, 103-106.

Polin H, Hufnagl P, Haunschmid R, Gruber F, Ladurner G, 2004, Molecular evidence of *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* ticks and wild animals in Austria. J Clin Microbiol 42, 2285-2286.

R Development Core Team, 2012, R: A language and environment for statistical computing. Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.

Randolph SE, Gern L, Nuttall PA, 1996, Co-feeding ticks: Epidemiological significance for tick-borne pathogen transmission. Parasitol Today 12, 472-479.

Rar VA, Epikhina TI, Livanova NN, Panov VV, Doroschenko EK, Pukhovskaya NM, Vysochina NP, Ivanov LI, 2011, Genetic variability of *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes persulcatus* ticks and small mammals in the Asian part of Russia. Vector Borne Zoonotic Dis 11, 1013-1021.

Regnery RL, Spruill CL, Plikaytis BD, 1991, Genotypic identification of rickettsiae and estimation of intraspecies sequence divergence for portions of two rickettsial genes. J Bacteriol 173, 1576-1589.

Rizzoli A, Hauffe H, Carpi G, Vourc HG, Neteler M, Rosà R, 2011, Lyme borreliosis in Europe. Euro Surveill 16.

Rizzoli A, Hauffe HC, Tagliapietra V, Neteler M, Rosà R, 2009, Forest structure and roe deer abundance predict tick-borne encephalitis risk in Italy. PLoS One 4, e4336.

Scharf W, Schauer S, Freyburger F, Petrovec M, Schaarschmidt-Kiener D, Liebisch G, Runge M, Ganter M, Kehl A, Dumler JS, Garcia-Perez AL, Jensen J, Fingerle V, Meli ML, Ensser A, Stuen S, von Loewenich FD, 2011, Distinct host species correlate with *Anaplasma phagocytophilum ankA* gene clusters. J Clin Microbiol 49, 790-796.

Schex S, Dobler G, Riehm J, Müller J, Essbauer S, 2011, *Rickettsia* spp. in wild small mammals in Lower Bavaria, South-Eastern Germany. Vector Borne Zoonotic Dis 11, 493-502.

Schorn S, Pfister K, Reulen H, Mahling M, Manitz J, Thiel C, Silaghi C, 2011a, Prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* in Bavarian public parks, Germany. Ticks Tick Borne Dis 2, 196-203.

Schorn S, Pfister K, Reulen H, Mahling M, Silaghi C, 2011b, Occurrence of *Babesia* spp., *Rickettsia* spp. and *Bartonella* spp. in *Ixodes ricinus* in Bavarian public parks, Germany. Parasit Vectors 4, 135.

Silaghi C, Gilles J, Höhle M, Fingerle V, Just FT, Pfister K, 2008a, *Anaplasma phagocytophilum* infection in *Ixodes ricinus*, Bavaria, Germany. Emerg Infect Dis 14, 972-974.

Silaghi C, Gilles J, Höhle M, Pradel I, Just FT, Fingerle V, Küchenhoff H, Pfister K, 2008b, Prevalence of spotted fever group rickettsiae in *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) in southern Germany. J Med Entomol 45, 948-955.

Silaghi C, Hamel D, Pfister K, Rehbein S, 2011a, *Babesia* species and co-infection with *Anaplasma phagocytophilum* in free-ranging ungulates from Tyrol (Austria). Wien. Tierärztliche Mschr.-Vet. Med. Austria 98 (2011), 268-274.

Silaghi C, Hamel D, Thiel C, Pfister K, Passos LM, Rehbein S, 2011b, Genetic variants of *Anaplasma phagocytophilum* in wild caprine and cervid ungulates from the Alps in Tyrol, Austria. Vector Borne Zoonotic Dis 11, 355-362.

Silaghi C, Hamel D, Thiel C, Pfister K, Pfeffer M, 2011c, Spotted fever group rickettsiae in ticks, Germany. Emerg Infect Dis 17, 890-892.

Silaghi C, Kauffmann M, Passos LM, Pfister K, Zweggarth E, 2011d, Isolation, propagation and preliminary characterisation of *Anaplasma phagocytophilum* from roe deer (*Capreolus capreolus*) in the tick cell line IDE8. Ticks Tick Borne Dis 2, 204-208.

Silaghi C, Liebisch G, Pfister K, 2011e, Genetic variants of *Anaplasma phagocytophilum* from 14 equine granulocytic anaplasmosis cases. Parasit Vectors 4, 161.

Silaghi C, Scheuerle MC, Friche Passos LM, Thiel C, Pfister K, 2011f, PCR detection of *Anaplasma phagocytophilum* in goat flocks in an area endemic for tick-borne fever in Switzerland. Parasite 18, 57-62.

Silaghi C, Skuballa J, Thiel C, Pfister K, Petney T, Pfäffle M, Taraschewski H, Passos LM, 2012a, The European hedgehog (*Erinaceus europaeus*)-a suitable reservoir for variants of *Anaplasma phagocytophilum*? Ticks Tick Borne Dis 3, 49-54.

Silaghi C, Woll D, Hamel D, Pfister K, Mahling M, Pfeffer M, 2012b, *Babesia* spp. and *Anaplasma phagocytophilum* in questing ticks, ticks parasitizing rodents and the parasitized rodents - Analyzing the host-pathogen-vector interface in a metropolitan area. Parasit Vectors 5, 191.

Skarphéðinsson S, Jensen PM, Kristiansen K, 2005, Survey of tickborne infections in Denmark. Emerg Infect Dis 11, 1055-1061.

Stańczak J, Racewicz M, Michalik J, Cieniuch S, Sikora B, Skoracki M, 2009, Prevalence of infection with *Rickettsia helvetica* in feeding ticks and their hosts in western Poland. Clin Microbiol Infect 15 Suppl 2, 328-329.

Stefanidesova K, Kocianova E, Boldis V, Kostanova Z, Kanka P, Nemethova D, Spitalska E, 2008, Evidence of *Anaplasma phagocytophilum* and *Rickettsia helvetica* infection in free-ranging ungulates in central Slovakia. European Journal of Wildlife Research 54, 519-524.

Stuen S, Grøva L, Granquist EG, Sandstedt K, Olesen I, Steinshamn H, 2011, A comparative study of clinical manifestations, haematological and serological responses after experimental infection with *Anaplasma phagocytophilum* in two Norwegian sheep breeds. Acta Vet Scand 53, 8.

Tampieri MP, Galuppi R, Bonoli C, Cancrini G, Moretti A, Pietrobelli M, 2008, Wild ungulates as *Babesia* hosts in northern and central Italy. Vector Borne Zoonotic Dis 8, 667-674.

Tatchell RJ, Moorhouse DE, 1970, Neutrophils: their role in the formation of a tick feeding lesion. *Science* 167, 1002-1003.

Telfer S, Birtles R, Bennett M, Lambin X, Paterson S, Begon M, 2008, Parasite interactions in natural populations: insights from longitudinal data. *Parasitology* 135, 767-781.

Telfer S, Lambin X, Birtles R, Beldomenico P, Burthe S, Paterson S, Begon M, 2010, Species interactions in a parasite community drive infection risk in a wildlife population. *Science* 330, 243-246.

Tsao JI, 2009, Reviewing molecular adaptations of Lyme borreliosis spirochetes in the context of reproductive fitness in natural transmission cycles. *Vet Res* 40, 36.

Vor T, Kiffner C, Hagedorn P, Niedrig M, Rühe F, 2010, Tick burden on European roe deer (*Capreolus capreolus*). *Exp Appl Acarol* 51, 405-417.

Zamoto A., Tsuji M., Wei Q., Cho S.H., Shin E.H., Kim T.S., Leonova G.N., Hagiwara K., Asakawa, M., Kariwa H., Takashima I., Ishihara C., 2004, Epizootiologic survey for *Babesia microti* among small wild mammals in northeastern Eurasia and a geographic diversity in the beta-tubulin gene sequences. *J Vet Med Sci* 66, 785-792.

5.3. Publikation 3

Diversity of *Babesia* and *Rickettsia* species in questing *Ixodes ricinus* – a longitudinal study in urban, pasture and natural habitats

Evelyn Overzier¹, Kurt Pfister¹, Claudia Thiel¹, Ingrid Herb², Monia Mahling², Cornelia Silaghi¹

Vector-Borne and Zoonotic Diseases (2013), Impact Factor: 2.437

Accepted for publication 22.02.2013

¹Comparative Tropical Medicine and Parasitology, Ludwig-Maximilians-Universität München, Munich, Germany

²Statistical Consulting Unit, Department of Statistics, Ludwig-Maximilians-Universität München, Munich, Germany

Diversity of *Babesia* and *Rickettsia* species in questing *Ixodes ricinus* – a longitudinal study in urban, pasture and natural habitats

Evelyn Overzier^{§1}, Kurt Pfister¹, Claudia Thiel¹, Ingrid Herb², Monia Mahling², Cornelia Silaghi¹

[§]Corresponding author

¹Comparative Tropical Medicine and Parasitology, Ludwig-Maximilians-Universität München, Munich, Germany

²Statistical Consulting Unit, Department of Statistics, Ludwig-Maximilians-Universität München, Munich, Germany

Corresponding author:

Evelyn Overzier

Comparative Tropical Medicine and Parasitology

Ludwig-Maximilians-Universität München

Leopoldstr. 5

80802 Munich

Tel: +49 (0)89 2180 - 2816

Fax: +49 (0)89 2180 - 3623

Email addresses:

EO: evelyn.overzier@tropa.vetmed.uni-muenchen.de

KP: kurt.pfister@tropa.vetmed.uni-muenchen.de

IH: stablab.herb@gmx.de

MM: Monia.Mahling@stat.uni-muenchen.de

CT: claudia.thiel@tropa.vetmed.uni-muenchen.de

CS: cornelia.silaghi@tropa.vetmed.uni-muenchen.de

Abstract

In a previous study, our group investigated the *Babesia* (*B.*) spp. prevalence in questing *Ixodes* (*I.*) *ricinus* ticks from nine city parks in South Germany in the years 2009/2010. This showed predominant prevalence of *B. venatorum* (in previous literature also known as *Babesia* sp. EU1) especially in those parks in a more natural condition and with occurrence of large wild animals such as roe deer. In order to obtain longitudinal data and to broaden the knowledge about this pathogen, further investigations were carried out in 2011/2012 in four of those city parks. Two additional habitat types were chosen for comparison of prevalence data and species analysis focusing on occurrence of potential reservoir hosts. A total of 10,303 questing *I. ricinus* were collected in four city parks, a pasture and a natural area in Bavaria and a representative number of samples was investigated for prevalence of DNA of *Babesia* spp. (n=4,381) and *Rickettsia* (*R.*) spp. (n=2,186) by PCR. In the natural and pasture area a significantly higher *Babesia* spp. prevalence compared to the urban area was detected. The natural area revealed sequences of *B. microti*, *B. venatorum* and *B. capreoli*. In the pasture and urban habitat predominantly *B. venatorum* was found, whereas *B. capreoli* was less frequent and only one *B. microti* – infected tick was found. All *B. microti* sequences were 100% identical to the zoonotic Jena/Germany strain. For *Rickettsia* spp., the significantly highest prevalence was also detected in the natural and pasture area, whereas lower prevalence was found in the urban area. Sequence analysis revealed *R. helvetica* (98%) and *R. monacensis* (2%). Prevalence rates and occurrence of *Babesia* spp. and *Rickettsia* spp. differed in urban, pasture and natural sites most likely depending on the habitat structure (natural or cultivated) and therefore on the appearance and availability of reservoir hosts like roe deer or small mammals.

Running title: *Babesia* and *Rickettsia* species in *Ixodes ricinus*

Keywords: *Babesia* spp., *Rickettsia* spp., *Ixodes ricinus*, reservoir host, habitat types

Introduction

During 2009 and 2010, we investigated nine city parks in South Germany for the occurrence of the tick-borne pathogens *Babesia* spp. and *Rickettsia* spp. (Schorn et al., 2011b). Predominantly *B. venatorum* (in previous literature also known as *Babesia* sp. EU1) was detected. Most *Babesia* positive ticks were found on study sites in a more natural state and with a permanent population of large ungulates. Interestingly, no *B. microti* sequence was found in the investigated city parks (Schorn et al., 2011b). *Babesia* spp. need two hosts (ticks and vertebrates) for a successful completion of life cycle (Schnittger et al., 2012). Roe deer (*Capreolus capreolus*) are considered as reservoir hosts for *B. capreoli* and *B. venatorum* (*Babesia* sp. EU1) (Malandrin et al., 2010; Bonnet et al., 2007a; Duh et al., 2005) and small mammals such as voles and shrews for *B. microti* (Duh et al., 2003; Karbowiak, 2004; Sinski et al., 2006). Human babesiosis is reported frequently in the USA (Herwaldt et al., 2012), whereas only few cases have been described in Europe so far, mainly in immunocompromised patients (Homer et al., 2000; Hunfeld et al., 2008). Besides *B. divergens* (Martinot et al., 2011) and *B. microti* (Hildebrandt et al., 2007), also *B. venatorum* (*Babesia* sp. EU1) has been reported associated to human disease (Herwaldt et al., 2003).

Rickettsia spp. cause tick- or flea-borne rickettsioses in humans (Parola et al. 2005). *R. helvetica* and *R. monacensis* were previously detected in *I. ricinus* in urban and natural areas in Southern Germany with prevalence ranging from 4% to 13% depending on stages (Schorn et al., 2011b; Silaghi et al., 2008). The vertebrate reservoir host for *Rickettsia* spp. remains unclear, but rodents and other small mammals have been proposed for *R. helvetica* and *R. monacensis* (Burri et al., 2011; Schex et al., 2011). Birds have also been discussed as possible reservoir hosts for *Rickettsia* spp. (Santos-Silva et al., 2006; Stanczak et al., 2009). The pathogenicity of *R. helvetica* in humans is still in dispute, but was mentioned in context with febrile illness, meningitis (Nilsson et al., 2010) and sudden cardiac failure (Fournier et al., 2000; Nilsson et al., 1999). *R. monacensis* was reported as causative agent of Mediterranean Spotted Fever-like illness in Italy (Madeddu et al., 2012).

The aims of this study were the comparison of

- (i) the occurrence of *Babesia* spp. in 2011 and 2012 in questing *I. ricinus* from city parks with previous results from 2009 and 2010 (Schorn et al., 2011b)
- (ii) the prevalence and species diversity of *Babesia* spp. and *Rickettsia* spp. in questing *I. ricinus* ticks collected from areas with heterogeneous habitat structures and reservoir hosts

Material and Methods

Study sites

Six study sites in South-Germany were investigated in the years 2011 and 2012. The sites included four urban areas located in the cities of Munich (M2, M3) and Regensburg (R1) and close to Lake Starnberg south of Munich (B) as previously described (Schorn et al., 2011a; b), one pasture area between Lake Starnberg and Lake Ammersee ('Kerschlach', K) and one natural forest area about 44 km South of the city of Augsburg ('Angelberger Forst', T). Detailed description of geographic data and a map showing the location of study sites have been published elsewhere (Overzier et al., 2012). As the present study pursues a different focus than the studies previously investigating city parks of the urban area (Schorn et al., 2011a; b), the study site description of the urban sites is extended.

Urban area. Sampling sites M2 ('English Garden'; 375ha) is a large city center park divided by a road into a northern and a southern part. The southern part where sampling collection took place is under strong anthropogenic influence, highly frequented by visitors and dogs, maintained by gardening (e.g. mowing) and intensively used in summer with permission for park visitors to leave the walkways. Interaction between domestic and wild animals is limited to mice, hedgehogs (*Erinaceus europaeus*), foxes (*Vulpes vulpes*), birds and so on, as big wild mammals such as roe deer (*Capreolus capreolus*) or wild boar (*Sus scrofa*) are non-existent in this part of the park.

Sampling site M3 ('Nymphenburger-Schlosspark'; 141ha) is a nature-orientated city park, surrounded by park walls and included in a nature conservation program. More forest-like structures with higher tree density, scrub and wild animals such as roe deer exist in this park. Grass areas in M3 are extensively used, less frequently mowed, therefore areas with longer grass exist and park visitors have to stay on the walkways.

Sampling site R1 ('Dörnbergpark'; 7.4ha) is located in the city center of Regensburg and

surrounded by a wall. Visitors are allowed to leave the walkways and to use the mowed grass areas in summer. Due to the small size and the inner city location of sampling site R1 there is no occurrence of big mammals like roe deer or wild boar. 26 different bird species are common in this park and for 20 bird species it is an important habitat for brood (Stadt Regensburg Umweltreferat-Gartenamt, 1996).

Sampling site B ('Schlosspark-Berg' [30 ha (public ~18 ha / private ~12 ha)]) is a forest-like park on the Eastern shore of Lake Starnberg with scrub and walkways. Large wild mammals such as roe deer and foxes exist and hunting is practiced. Dogs need to be kept on the leash in sampling sites M3, B and R. Deciduous trees and bushes exist in all investigated city parks (Schorn et al., 2011a; b).

Pasture area (site K). Two fenced pastures (each ~ 8ha) used for stock breeding of cattle surrounded by a forest area were investigated. Questing ticks were collected inside the fenced area next to the forest. Contact between wild animals and domestic cattle exists, because animals from the forest can enter the pasture.

Natural area (site T). The 'Angelberger Forst' (641ha), a forest which is also included in a nature conservation program with occurrence of several wild animals, very low frequency of visitors and therefore little to no interaction between wild and domestic animals, was investigated. This area has been described in detail before (Overzier et al., accepted).

Collection of samples

In April, May and June 2011 and 2012 respectively, questing ticks were collected with a 1m² white cotton flag once a month at each study site and stored in 70% ethanol. For measuring the tick abundance, an area of 300m² was flagged, sectioned in three transects of 100m² each. The objective was to collect a minimum of 40 ticks of each gender and stage (without larvae) per site and month. If the number of collected ticks on 300m² was too low, additional ticks were collected near by each transect to reach the mentioned number. The ticks were washed twice with distilled water, identified (Hillyard, 1996) and stored at -20°C until further investigation as described (Schorn et al., 2011a). Larvae were included in this study in pools of up to five ticks as transovarial transmission is known for large *Babesia* spp. (Bonnet et al., 2007a; b; Homer et al., 2000) and *Rickettsia* spp. (Socolovschi et al., 2009). Results of the tick density per site and month and relationship of stages have been published elsewhere (Overzier et al., 2012).

DNA extraction, PCR amplification and sequencing

DNA extraction was performed with the automated Maxwell[®] 16 System (Promega, Mannheim, Germany) from a maximum of 60 questing ticks of each developmental stage, gender and month. Measuring of DNA concentration was done with a Spectrophotometer (Nano Drop[®] ND-1000, PeqLab Erlangen, Germany). All samples with a DNA concentration $\geq 10\text{ng}/\mu\text{L}$ were diluted 1:4 with elution buffer to raise the volume. This step was done to avoid false negative results caused by highly concentrated DNA inhibiting the PCR process. DNA concentration used for PCR reached from $1.8\text{ng}/\mu\text{L}$ up to $61.4\text{ng}/\mu\text{L}$ with a mean concentration of $12.0\text{ng}/\mu\text{L}$. Details of the DNA extraction process have been published elsewhere (Overzier et al., accepted).

The *18S rRNA* gene of *Babesia* spp. and the *gltA* and *ompB* gene of *Rickettsia* spp. were detected by conventional PCR and species identification was carried out by sequencing and sequence analysis as previously described (Schorn et al., 2011b). The PCR for *Babesia* spp. DNA was carried out in ticks from 2011 and 2012, whereas PCR for *Rickettsia* spp. was only performed in ticks from 2011.

Statistical analysis

Two logistic regression models were estimated to investigate the effect of gender, month and year on the probability of positivity. One model also included habitat, the other one the different sites. A simultaneous test for general linear hypotheses based on multiple comparisons of means with Tukey Contrasts (Hothorn et al., 2008) was used to test for differences between gender, month, habitat and site respectively. Statistical analysis was performed accepting the minimum prevalence (in a positive pool of larvae, one tick was assumed as positive). The variable “sampling site R1” was removed for the statistical analysis of *Babesia* spp. because no infection was seen on this sampling site and therefore the estimation of the parameters was not possible. Statistical analysis was performed with R version 2.15.1 (R Development Core Team, 2012).

Results

A total of 2,186 *I. ricinus* ticks in 2011 and 2,195 in 2012 was investigated.

Prevalence of *Babesia* spp. in *I. ricinus*. A total of 1.0% (45/4,381) of investigated questing ticks was positive for DNA of *Babesia* spp. in 2011 and 2012.

The following prevalences were detected in the different habitat types (Table 1):

- **urban area:**
 - adults: 0.3% (3/889), nymphs: 0.0% (0/500) in 2011
 - adults: 0.5% (5/947), nymphs: 1.5% (7/464) in 2012
- **pasture area:**
 - adults: 1.8% (4/225), nymphs: 2.1% (3/140) in 2011
 - adults: 1.3% (3/234), nymphs: 0.8% (1/120) in 2012
- **natural area:**
 - adults: 2.5% (2/79), nymphs: 3.3% (4/120) in 2011
 - adults: 3.1% (7/226), nymphs: 3.3% (4/120), larvae: 2.5-12.5% [(2-10/80) including 2 positive pools] in 2012

There was no statistically significant difference in prevalence between stage and gender, as well as between months (data not shown) and years (Table 1). The natural ($p < 0.001$) and the pasture habitat ($p < 0.05$) showed statistically significantly higher prevalence than the urban habitat. The prevalence on study site 'T' (natural) was significantly higher than on study sites 'M2' and 'B' (urban) ($p < 0.05$).

18S rRNA gene. All *Babesia* spp. positive samples were sequenced (Figure 1).

Overall 27x *B. venatorum*, 6x *B. capreoli*, 12x *B. microti* strain Jena/Germany were detected by comparison with GenBank sequences. Distribution in the different habitats was as followed:

- **urban area:** 11x *B. venatorum* (sites: 8x M3, 3x B), 3x *B. capreoli* (sites: 2x M3, 1x B), 1x *B. microti* strain Jena/Germany (site M2)
- **pasture area:** 9x *B. venatorum*, 2x *B. capreoli*
- **natural area:** 7x *B. venatorum* (including 2 pools of larvae), 1x *B. capreoli*, 11x *B. microti* strain Jena/Germany

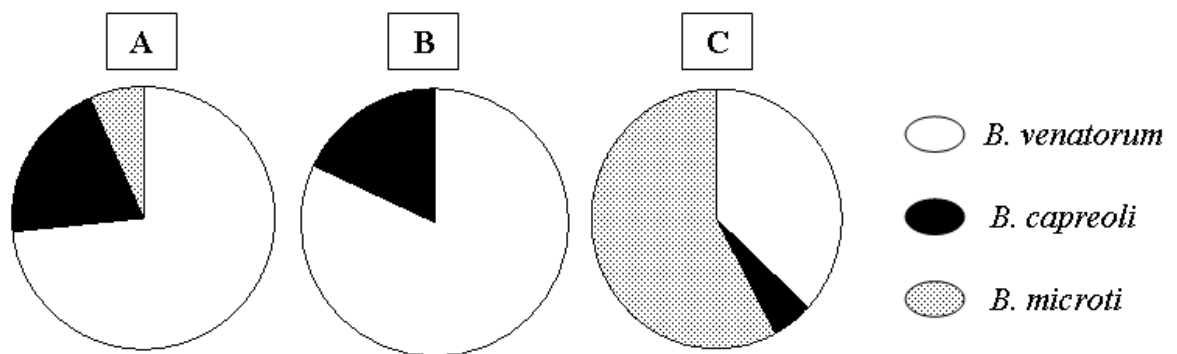
B. venatorum sequences were 99-100% identical to sequences previously found in roe deer in the natural area (GenBank accession nos. JX627351, JX627352) and in *I. ricinus* ticks from the previous study in the city parks (GenBank accession nos. JN036420-JN036426).

B. capreoli sequences showed 100% identity to sequences from *I. ricinus* and roe deer previously found in the natural area (GenBank accession nos. JX627350, JX627353, JX627354, JX627358). One sequence found on the pasture was 99% identical to both *B. capreoli* and *B. divergens* sequences (GenBank accession nos. JX083983, JX083981).

B. microti sequences showed 100% identity to sequences found in *I. ricinus* ticks from a previous study in urban areas in Saxony, Saarland and Bavaria (GenBank accession nos. JQ886033-JQ886058) and the human zoonotic strain Jena/Germany (GenBank accession nos. EF413181).

Sequences obtained in this study were deposited in GenBank under the following accession nos.: *B. venatorum* [GenBank: KC007116-KC007118], *B. microti* [GenBank: KC007119, KC007120], *B. capreoli* [GenBank: KC007121, KC007122]

Figure 1: Prevalence of *Babesia* (*B.*) *venatorum*, *B. microti* and *B. capreoli*



A: urban area B: pasture area C: natural area

Prevalence of *Rickettsia* spp. in *I. ricinus*. A total of 8.7% (191/2,186) of questing ticks was positive for DNA of *Rickettsia* spp. in 2011.

The following prevalences were detected in the different habitat types (Table 1):

- **urban area:** adults: 8.7% (77/889), nymphs: 5.0% (25/500), larvae: 2.2-7.5% [(2-7/93) including 2 positive pools]
- **pasture:** adults: 13.3% (30/225), nymphs: 15.7% (22/140)
- **natural area:** adults: 13.9% (11/79), nymphs: 17.5% (21/120), larvae: 2.2-10.1% [(3-14/139) including 3 positive pools]

There was no statistically significant difference in prevalence between months (data not shown). The prevalence in adults and nymphs was statistically significantly higher than in larvae [($p < 0.01$); in a positive pool of larvae, one tick was assumed as positive]. The natural and the pasture habitat showed statistically significantly higher prevalence than the urban habitat ($p < 0.001$). Study sites ‘M3’ (urban), ‘K’ (pasture) and ‘T’ (natural) showed a statistically significantly higher prevalence than study site ‘R1’ and ‘M2’ ($p < 0.01$) and exclusively ‘M3’ than ‘B’ [all urban sites ($p < 0.05$)].

***gltA*-gene.** 51 *Rickettsia* spp. positive questing tick samples were sequenced; 47 sequences (29x urban, 9x pasture, 9x natural) had 100% identity to *R. helvetica* (GenBank accession nos. JQ669952, HM371185) and one sequence 100% identity (nymph, urban area, site B) to *R. monacensis* found in *I. ricinus* (GenBank accession no. JX003686). Sequencing of three specific rickettsial products failed.

***ompB*-gene.** The *R. monacensis* sample was further analysed with PCR targeting the *ompB* gene and sequencing revealed 100% identity to *R. monacensis* strain IR/Munich (GenBank accession no. EF380356).

Sequences obtained in this study were deposited in GenBank under the following accession nos.: *R. helvetica* *gltA*-gene [GenBank: KC007123-KC007126], *R. monacensis* *gltA*-gene [GenBank: KC007127] and *ompB*-gene [GenBank KC137254]

Table 1: Prevalence of *Babesia* spp. and *Rickettsia* spp. in investigated *Ixodes ricinus* per site and habitat for 2011 and 2012

Habitat	Site	Year	Positive ticks (%)									
			No. of investigated ticks ¹⁾				<i>Babesia</i> spp. ²⁾				<i>Rickettsia</i> spp. ^{3,4)}	
			All ticks	A	N	L pool [n ⁵⁾]	A	N	L pool [n ⁵⁾]	A	N	L pool [n ⁵⁾]
Urban	M2	2011	362	240	120	1 [2]	0	0	0	11 (4.6)	4 (3.3)	1 [1-2] (50-100)
		2012	358	240	118	0 [0]	0	1 (0.8)	0	nd	nd	nd
	M3	2011	401	259	140	2 [2]	2 (0.8)	0	0	39 (15.1)	12 (8.6)	0
		2012	352	232	120	0 [0]	4 (1.7)	4 (3.3)	0	nd	nd	nd
	R1	2011	393	240	120	9 [33]	0	0	0	13 (5.4)	5 (4.2)	1 [1-5] (3.0-15.2)
		2012	355	235	120	0 [0]	0	0	0	nd	nd	nd
	B	2011	326	150	120	12 [56]	1 (0.7)	0	0	14 (9.3)	4 (3.3)	0
		2012	349	240	106	1 [3]	1 (0.4)	2 (1.9)	0	nd	nd	nd
	Total	2011	1482	889	500	24 [93]	3 (0.3)	0	0	77 (8.7)	25 (5.0)	2 [2-7] (2.2-7.5)
		2012	1414	947	464	1 [3]	5 (0.5)	7 (1.5)	0	nd	nd	nd
Pasture	K	2011	366	225	140	1 [1]	4 (1.8)	3 (2.1)	0	30 (13.3)	22 (15.7)	0
		2012	355	234	120	1 [1]	3 (1.3)	1 (0.8)	0	nd	nd	nd
Natural	T	2011	338	79	120	29 [139]	2 (2.5)	4 (3.3)	0	11 (13.9)	21 (17.5)	3 [3-14] (2.2-10.1)
		2012	426	226	120	16 [80]	7 (3.1)	4 (3.3)	2 [2-10] (2.5-12.5)	nd	nd	nd
All sites	Total	2011	2186	1193	760	54 [233]	9 (0.8)	7 (0.9)	0	118 (9.9)	68 (8.9)	5 [5-21] (2.1-9.0)
		2012	2195	1407	704	18 [84]	15 (1.1)	12 (1.7)	2 [2-10] (2.4-11.9)	nd	nd	nd

1) A=adults, N=nymphs, L=larvae

2) **urban:** 11x *B. venatorum*, 1x *B. microti* strain Jena/Germany (M2), 3x *B. capreoli* (2x M3, 1x B); **pasture:** 9x *B. venatorum*, 2x *B. capreoli*; **natural:** 7x *B. venatorum* (including 2 pools of larvae), 11x *B. microti* strain Jena/Germany, 1x *B. capreoli*

3) nd=not done

4) 47x *R. helvetica* (29x urban, 9x pasture, 9x natural), 1x *R. monacensis* (study site B)

5) n= number of larvae pooled

Discussion

The overall *Babesia* spp. prevalence in questing *I. ricinus* ticks did not show any obvious decrease or increase in the four city parks investigated in the four year survey from 2009/2010 (Schorn et al., 2011b) to 2011/2012 and ranged throughout between 0% and 2.3%. Similar rates were previously detected in Germany in the middle of an urban zone (Pichon et al., 2006), but rates were higher in renatured recreational areas in a metropolitan area in Eastern Germany (Silaghi et al. 2012). The urban sites in the present study left in a more natural condition (M3, B) offer a more suitable habitat for voles and shrews and populations of large ungulates are known there. These sites showed higher prevalence of *Babesia* spp. in all four years than the more cultivated and frequented urban sites (M2, R1) with therefore presumptive lower appearance of small mammals such as voles and shrews (Dickman and Doncaster, 1987) and no occurrence of big mammals like roe deer (Schorn et al., 2011b).

In the present study the highest prevalence of *Babesia* spp. in questing *I. ricinus* ticks was found in the natural area with similar occurrence of *B. microti* strain Jena/Germany and *B. venatorum* and less *B. capreoli* prevalence. Furthermore 2 of 16 pools of larvae were detected positive for *B. venatorum* in 2012 in the natural habitat. This *Babesia* spp. prevalence is lower than in natural or renatured habitats in Central Germany (Franke et al., 2010; Hildebrandt et al., 2010; 2011; Silaghi et al., 2012) or in a previously investigated forest area in Bavaria (Silaghi et al., 2012). Comparing the tick abundance of the investigated study sites and habitats (Overzier et al., 2012; Schorn et al., 2011a; b) there was no obvious correlation between tick density and *Babesia* spp. prevalence. Interestingly R1, the urban study site with the highest tick density/100m² out of the investigated study sites from 2010-2012 (35; 97; 51 respectively), showed the lowest or no *Babesia* spp. prevalence, respectively (Overzier et al., 2012; Schorn et al., 2011a; b). The most frequently detected *Babesia* species in the urban area (sites M3, B) and on the pasture (K) was *B. venatorum*. It was only detected in those urban study sites in a more natural condition where wild ungulates exist (M3, B) whereas it was not detected in more frequented and cultivated inner city parks without large ungulate species (M2, R1) and probably less frequent appearance of small mammals as voles and shrews. This result coincides with the findings of *B. venatorum* (*Babesia* sp. EU1) during 2009 and 2010 in these four city parks (Schorn et al., 2011b). Only 1 out of 6,739 *I. ricinus* ticks investigated in total in these four city parks over four years was *B. microti* positive, resulting in a prevalence of 0.015%. The appearance of feeding hosts for *I. ricinus* such as voles and shrews which serve as natural reservoir host for *B. microti* (Duh et al., 2003; Karbowiak, 2004; Sinski et al., 2006) and roe deer which harbours *B. capreoli* and *B. venatorum* (*Babesia* sp. EU1) (Malandrin et al., 2010; Bonnet et al., 2007a; Duh et al., 2005) may offer an explanation for this higher prevalence in ticks in the natural forest compared to the urban area. *B. microti* has been detected in Europe, for example in the bank vole (*Myodes glareolus*) (Beck et al., 2011; Duh et al., 2003; Tadin et al., 2012), the common shrew (*Sorex araneus*) (Bown et al., 2011) and the field vole (*Microtus agrestis*) (Bown et al., 2011), which are suggested as reservoir hosts, but also in the yellow-necked mouse (*Apodemus flavicollis*) (Beck et al., 2011; Duh et al., 2003; Sinski et al., 2006; Tadin et al., 2012). In Germany, *B. microti* has been detected previously in a striped field mouse (*Apodemus agrarius*) (Silaghi et al., 2012) and with a prevalence of 1.6% in rodents of the family *Arvicolidae* (Hartelt et al., 2008). Bank voles are most abundant in woodlands, whereas field vole and the common shrew achieve highest density in long grass and scrub (Dickman and Doncaster, 1987). Both bank voles and yellow-necked mice are common in the investigated natural area (Obiegala et al. unpublished). Roe deer investigated in the natural area during 2010 and 2011 showed 89.5% positivity for *Babesia* spp. (*B. capreoli* and *Babesia* sp.EU1) (Overzier et al., accepted).

Similar to *Babesia* spp., the overall prevalence of *Rickettsia* spp. in the urban area in 2011 was comparable to prevalence in the same study sites in 2009 (Schorn et al., 2011b). In the present study the significantly highest prevalence for *Rickettsia* spp. was found in the natural area and on the pasture. The prevalence in the natural area was similar to that previously found in a geographically close forest area [site W in (Silaghi et al., 2008)]. The lowest prevalence for *Rickettsia* spp. was also detected in the two more cultivated urban sites. No correlation between tick abundance and *Rickettsia* spp. prevalence was observed (Overzier et al., 2012; Schorn et al., 2011a; b). The results confirm observations from another previous study where significantly less *Rickettsia* spp. were detected in city parks compared to forest areas (Silaghi et al., 2008). Nonetheless, even in the smallest urban study site R1 prevalence of *Rickettsia* spp. of up to 5.4% was detected. Other animals such as birds which are multitudinous in study site R1 (Stadt Regensburg Umweltreferat-Gartenamt, 1996) should be considered as reservoir hosts for *Rickettsia* spp. in urban areas. Previous studies negated (Stanczak et al., 2009) or approved (Santos-Silva et al., 2006) the reservoir potential of birds for *Rickettsia* spp.. However, as *Rickettsia* spp. are not only transstadially, but also transovarially transmitted in ticks (5 of 54 pools of questing larvae were found positive in the present study) *I. ricinus* should be considered as important reservoir host (Socolovschi et al., 2009).

Conclusion

For both investigated pathogens (*Babesia* spp. and *Rickettsia* spp.) the prevalence was higher in questing *I. ricinus* ticks collected in the natural forest area compared to the urban area. In the urban area the prevalence was higher in more natural than more cultivated city parks. Regarding the longitudinal study only little year-to-year variation in the occurrence of *Babesia* spp. and *Rickettsia* spp. were found. The difference in prevalence of the two pathogens most probably depends on the habitat structure and therefore the appearance or absence of diverse reservoir hosts. The potential reservoir competence of vertebrate hosts needs to be investigated in controlled settings, as the vertebrate host plays a crucial role in the life cycle of ticks and tick-transmitted pathogens and effective control measures can not be implemented without this basic knowledge.

Acknowledgments

The authors address special thanks to Tim Tiedemann for assistance in laboratory work. This study was partially funded by EU grant FP7-261504 EDENext and is catalogued by the EDENext Steering Committee as EDENext083 (<http://www.edenext.eu/>). The contents of this publication are the sole responsibility of the authors and do not necessarily reflect the views of the European Commission.

Author Disclosure Statement

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Beck R., Vojta L., Curković S., Mrljak V., et al., 2011, Molecular survey of *Babesia microti* in wild rodents in central Croatia. Vector Borne Zoonotic Dis 11, 81-83.
- Bonnet S., Jouglin M., L'Hostis M., Chauvin A., 2007a, *Babesia* sp. EU1 from roe deer and transmission within *Ixodes ricinus*. Emerg Infect Dis 13, 1208-1210.
- Bonnet S., Jouglin M., Malandrin L., Becker C., Agoulon A., L'Hostis M., Chauvin A., 2007b, Transstadial and transovarial persistence of *Babesia divergens* DNA in *Ixodes ricinus* ticks fed on infected blood in a new skin-feeding technique. Parasitology 134, 197-207.
- Bown K.J., Lambin X., Telford G., Heyder-Bruckner D., et al., 2011, The common shrew (*Sorex araneus*): a neglected host of tick-borne infections? Vector Borne Zoonotic Dis 11, 947-953.
- Burri C., Dupasquier C., Bastic V., Gern L., 2011, Pathogens of emerging tick-borne diseases, *Anaplasma phagocytophilum*, *Rickettsia* spp., and *Babesia* spp., in ixodes ticks collected from rodents at four sites in Switzerland (Canton of Bern). Vector Borne Zoonotic Dis 11, 939-944.

- Dickman C.R., Doncaster C.P., 1987, The Ecology of Small Mammals in Urban Habitats. I. Populations in a Patchy Environment. *Journal of Animal Ecology* 56, 629-640.
- Duh D., Petrovec M., Bidovec A., Avsic-Zupanc T., 2005, Cervids as *Babesia* hosts, Slovenia. *Emerg Infect Dis* 11, 1121-1123.
- Duh D., Petrovec M., Trilar T., Avsic-Zupanc T., 2003, The molecular evidence of *Babesia microti* infection in small mammals collected in Slovenia. *Parasitology* 126, 113-117.
- Fournier P.E., Grunnenberger F., Jaulhac B., Gastinger G., et al., 2000, Evidence of *Rickettsia helvetica* infection in humans, eastern France. *Emerg Infect Dis* 6, 389-392.
- Franke J., Fritsch J., Tomaso H., Straube E., et al., 2010, Coexistence of pathogens in host-seeking and feeding ticks within a single natural habitat in Central Germany. *Appl Environ Microbiol* 76, 6829-6836.
- Hartelt K., Pluta S., Oehme R., Kimmig P., 2008, Spread of ticks and tick-borne diseases in Germany due to global warming. *Parasitol Res* 103 Suppl 1, S109-116.
- Herwaldt B.L., Cacciò S., Gherlinzoni F., Aspöck H., et al., 2003, Molecular characterization of a non-*Babesia divergens* organism causing zoonotic babesiosis in Europe. *Emerg Infect Dis* 9, 942-948.
- Herwaldt B.L., Montgomery S., Wodhall D., Bossermann E.A., 2012, Babesiosis Surveillance-18States, 2011. *MMWR*; July 13, 2012 / 61(27);505-509, <http://www.cdc.gov/parasites/babesiosis>.
- Hildebrandt A., Fritsch J., Franke J., Sachse S., et al., 2011, Co-circulation of emerging tick-borne pathogens in Middle Germany. *Vector Borne Zoonotic Dis* 11, 533-537.

- Hildebrandt A., Hunfeld K.P., Baier M., Krumbholz A., et al., 2007, First confirmed autochthonous case of human *Babesia microti* infection in Europe. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 26, 595-601.
- Hildebrandt A., Pauliks K., Sachse S., Straube E., 2010, Coexistence of *Borrelia* spp. and *Babesia* spp. in *Ixodes ricinus* ticks in Middle Germany. Vector Borne Zoonotic Dis 10, 831-837.
- Hillyard P.D., 1996, Ticks of North-West Europe, Synopses of the British Fauna No.52. The Linnean Society of London, London.
- Homer M.J., Aguilar-Delfin I., Telford S.R., 3rd, Krause P.J., et al., 2000, Babesiosis. Clin Microbiol Rev 13, 451-469.
- Hothorn T., Bretz F., Westfall P., 2008, Simultaneous Inference in General Parametric Models. Biometric Journal, 50 (3), 346-363.
- Hunfeld K.P., Hildebrandt A., Gray J.S., 2008, Babesiosis: recent insights into an ancient disease. Int J Parasitol 38, 1219-1237.
- Karbowiak G., 2004, Zoonotic reservoir of *Babesia microti* in Poland. Pol J Microbiol 53 Suppl, 61-65.
- Madeddu G., Mancini F., Caddeo A., Ciervo A., et al., 2012, *Rickettsia monacensis* as cause of Mediterranean spotted fever-like illness, Italy. Emerg Infect Dis 18, 702-704.

- Malandrino L., Jouglin M., Sun Y., Brisseau N., et al., 2010, Redescription of *Babesia capreoli* (Enigk and Friedhoff, 1962) from roe deer (*Capreolus capreolus*): isolation, cultivation, host specificity, molecular characterisation and differentiation from *Babesia divergens*. Int J Parasitol 40, 277-284.
- Martinot M., Zadeh M.M., Hansmann Y., Grawey I., et al., 2011, Babesiosis in immunocompetent patients, Europe. Emerg Infect Dis 17, 114-116.
- Nilsson K., Elfving K., Pahlson C., 2010, *Rickettsia helvetica* in patient with meningitis, Sweden, 2006. Emerg Infect Dis 16, 490-492.
- Nilsson K., Lindquist O., Pahlson C., 1999, Association of *Rickettsia helvetica* with chronic perimyocarditis in sudden cardiac death. Lancet 354, 1169-1173.
- Overzier E., Pfister K., Thiel C., Herb I., Mahling M., Silaghi C., 2012, *Anaplasma phagocytophilum* in questing *Ixodes ricinus* ticks: a comparison of the prevalence and partial *16S rRNA* gene variants in urban, pasture and natural habitats. Appl Environ Microbiol. 2012 Dec 21. [Epub ahead of print]
- Overzier E., Pfister K., Herb I., Mahling M., Böck G., Jr. and Silaghi C., 2013, Detection of tick-borne pathogens in roe deer (*Capreolus capreolus*), questing ticks (*Ixodes ricinus*) and ticks infesting roe deer in southern Germany. Ticks Tick Borne Dis, accepted
- Parola P., Davoust B., Raoult D., 2005, Tick- and flea-borne rickettsial emerging zoonoses. Vet Res 36(3): 469-492.
- Pichon B., Kahl O., Hammer B., Gray J.S., 2006, Pathogens and host DNA in *Ixodes ricinus* nymphal ticks from a German forest. Vector Borne Zoonotic Dis 6, 382-387.

- R Development Core Team, 2012, R: A language and environment for statistical computing. Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.
- Santos-Silva M.M., Sousa R., Santos A.S., Melo P., et al., 2006, Ticks parasitizing wild birds in Portugal: detection of *Rickettsia aeschlimannii*, *R. helvetica* and *R. massiliae*. Exp Appl Acarol 39, 331-338.
- Schex S., Dobler G., Riehm J., Müller J., et al., 2011, *Rickettsia* spp. in wild small mammals in Lower Bavaria, South-Eastern Germany. Vector Borne Zoonotic Dis 11, 493-502.
- Schnittger L., Rodriguez A.E., Florin-Christensen M., Morrison D.A., 2012, *Babesia*: A world emerging. Infect Genet Evol 12, 1788-1809.
- Schorn S., Pfister K., Reulen H., Mahling M., et al., 2011a, Prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* in Bavarian public parks, Germany. Ticks Tick Borne Dis 2, 196-203.
- Schorn S., Pfister K., Reulen H., Mahling M., et al., 2011b, Occurrence of *Babesia* spp., *Rickettsia* spp. and *Bartonella* spp. in *Ixodes ricinus* in Bavarian public parks, Germany. Parasit Vectors 4, 135.
- Silaghi C., Gilles J., Höhle M., Pradel I., et al., 2008, Prevalence of spotted fever group rickettsiae in *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) in southern Germany. J Med Entomol 45, 948-955.
- Silaghi C., Woll D., Hamel D., Pfister K., et al., 2012, *Babesia* spp. and *Anaplasma phagocytophilum* in questing ticks, ticks parasitizing rodents and the parasitized rodents - Analyzing the host-pathogen-vector interface in a metropolitan area. Parasit Vectors 5, 191.

- Siński E., Bajer A., Welc R., Pawełczyk A., et al., 2006, *Babesia microti*: prevalence in wild rodents and *Ixodes ricinus* ticks from the Mazury Lakes District of North-Eastern Poland. Int J Med Microbiol 296 Suppl 40, 137-143.
- Socolovschi C., Mediannikov O., Raoult D., Parola P., 2009, The relationship between spotted fever group *Rickettsiae* and Ixodid ticks. Vet Res 40, 34.
- Stadt Regensburg Umweltreferat-Gartenamt, 1996, Der Dörnbergpark in Regensburg Parkpflegewerk Geschichte, Bestand, Zukunft, ISBN-Nr.: 3-925753-53-2.
- Stańczak J., Racewicz M., Michalik J., Cieniuch S., et al., 2009, Prevalence of infection with *Rickettsia helvetica* in feeding ticks and their hosts in western Poland. Clin Microbiol Infect 15 Suppl 2, 328-329.
- Tadin A., Turk N., Korva M., Margaletić J., et al., 2012, Multiple co-infections of rodents with hantaviruses, *Leptospira*, and *Babesia* in Croatia. Vector Borne Zoonotic Dis 12, 388-392

V. DISKUSSION

In der vorliegenden Studie wurde neben der Dichte wirtssuchender *I. ricinus*-Zecken aus drei verschiedenen Habitaten (Parkanlagen, Weide, Wald), die Prävalenz zeckenübertragener Erreger (*Babesia* spp., *A. phagocytophilum*, *Rickettsia* spp.) und Rehwild als potentiell Reservoir untersucht.

Die alle Standorte übergreifende *Babesia* spp.-Prävalenz in wirtssuchenden *I. ricinus* zeigte in den vier untersuchten Parkanlagen verglichen mit einer vorangegangenen Studie über den Untersuchungszeitraum von vier Jahren [2009/2010 (Schorn et al., 2011b) und 2011/2012] keine auffallende Ab- bzw. Zunahme. Es ergaben sich Werte zwischen 0% und 2,3%, ähnlich denen aus unterschiedlichen Gebieten in Norwegen (Øines et al., 2012) und Weißrussland (Reye et al., 2013), aber niedriger als in renaturierten Erholungsgebieten im Osten Deutschlands (Silaghi et al., 2012b). Wirtssuchende *I. ricinus*, die in den beiden stärker naturbelassenen Stadtparks (M3, B) gesammelt wurden, zeigten über den gesamten vierjährigen Untersuchungszeitraum [2009/2010 (Schorn et al., 2011b) und 2011/2012] eine höhere *Babesia* spp.-Prävalenz (~0,3%-2,3%) als wirtssuchende *I. ricinus* aus stärker kultivierten und höher von Besuchern frequentierten Parkanlagen (M2, R1 ~0%-0,5%). Diese beiden naturbelasseneren Parkanlagen (M3, B) beherbergen Bestände von Wildwiederkäuern [eigene Beobachtung; (Bayerisches Landesamt für Umwelt, 2004)], welche als Reservoir für *B. capreoli* bzw. *Babesia* sp. EU1 angesehen werden (Bonnet et al., 2007; Duh et al., 2005; Malandrin et al., 2010). In dieser Studie wurde die höchste *Babesia* spp.-Prävalenz (2,5%) in wirtssuchenden Zecken am Wald-Standort gefunden, wobei überwiegend *B. microti* strain Jena/Germany (1,4%) und *Babesia* sp. EU1 (0,9%) auftraten. *B. capreoli* war dagegen weniger häufig zu finden (0,1%). Diese gefundene *Babesia* spp.-Prävalenz im Wald war höher als in den untersuchten Parkanlagen in 2009/2010 (Schorn et al., 2011b), höher als in Waldgebieten in der Westschweiz und Polen (Lommano et al., 2012; Welc-Falęciak et al., 2012), jedoch niedriger als in anderen Waldgebieten aus Frankreich und Deutschland (Cotté et al., 2010; Hildebrandt et al., 2010b; 2011) und niedriger als auf einer Weide in Belgien (Lempereur et al., 2012). In zwei der Parkanlagen (M3, B) und auf der Weide (K) war *Babesia* sp. EU1 die am häufigsten zu findende *Babesia*-Spezies. Vergleichbar wurde in einer Studie in Belgien ausschließlich *Babesia* sp. EU1 und nicht, wie erwartet *B. divergens* in wirtssuchenden *I. ricinus* auf verschiedenen Rinderweiden mit Kontakt zu wildlebenden Wiederkäuern gefunden (Lempereur et al., 2012). Der in dieser Studie überwiegende Nachweis von *Babesia* sp. EU1 in zwei der vier untersuchten Parkanlagen ist vergleichbar den Ergebnissen aus den Jahren 2009 und 2010 (Schorn et al., 2011b). In diesen vier Parkanlagen wurde über einen Zeitraum von vier Jahren eine einzige Zecke aus 6.739

untersuchten *I. ricinus* Proben positiv auf *B. microti* getestet, was einer Gesamtprävalenz von 0,015% entspricht. Der Grund für den großen Unterschied in der gefundenen *B. microti*-Prävalenz in den Parkanlagen und dem Wald-Standort könnte eventuell in der habitatabhängigen unterschiedlichen Verfügbarkeit bestimmter Wühl- und Spitzmausarten liegen, die ein mögliches Reservoir für *B. microti* darstellen (Duh et al., 2003; Karbowski, 2004; Siński et al., 2006). *B. microti* wurde in Europa beispielsweise bereits in der Rötelmaus (Fam.: Wühl- bzw. Kurzschwanzmäuse) (Beck et al., 2011; Duh et al., 2003; Tadin et al., 2012), der Waldspitzmaus (Fam.: Spitzmäuse) (Bown et al., 2011) und der Erdmaus (Fam.: Wühl- bzw. Kurzschwanzmäuse) (Bown et al., 2011) gefunden, aber auch Nachweise aus Gelbhalsmäusen (Fam.: Langschwanzmäuse) sind beschrieben (Beck et al., 2011; Duh et al., 2003; Siński et al., 2006; Tadin et al., 2012). Rötelmäuse sind überwiegend in Waldgebieten zu finden, während Waldspitz- und Erdmäuse hochstehende Wiesen und Unterholz bevorzugen (Dickman and Doncaster, 1987). Sowohl Rötel- als auch Gelbhalsmäuse sind im untersuchten Wald-Standort heimisch (Obiegala et al. unveröffentlichte Daten).

An dem in dieser Arbeit untersuchten Wald-Standort war die *Babesia* spp.-Prävalenz (*B. capreoli* und *Babesia* sp. EU1) in Rehwild mit 89,5% höher als 26,1% bzw. 31,6% *B. capreoli*-positive Tiere in der Schweiz (Hoby et al., 2009) und Österreich (Silaghi et al., 2011a), höher als 31% in Italien [*B. divergens*, *Babesia* sp. “*microti*-ähnlich”, *Babesia* sp. EU1 und *Babesia* MO1 (Tampieri et al., 2008) und höher als 76,5% *B. divergens*- und *Babesia* sp. EU1-positive Rehe in Slowenien (Duh et al., 2005). Beim Vergleich der *Babesia* spp.-Prävalenz in Rehwild aus dieser Studie mit den Ergebnissen anderer Forschungsarbeiten muss berücksichtigt werden, dass Schwankungen in der gefundenen Prävalenz auch durch Anwendung unterschiedlicher PCR-Methoden begründet sein können. Eine mögliche andere denkbare Ursache für Schwankungen in der *Babesia* spp.-Prävalenz in Rehpopulationen könnte eine geographisch unterschiedliche Rehwild- bzw. Zeckendichte sein, die das Risiko mit dem Pathogen in Kontakt zu kommen erhöht bzw. senkt.

In der vorliegenden Studie konnte in 7,3% der von Rehen abgesammelten Zecken DNA von *Babesia* spp. nachgewiesen werden. Während an diesem Standort 89,5% der Rehe positiv für *Babesia* spp. waren (von welchen wiederum 90% *B. capreoli* war), enthielten nur 2,4% aller abgesammelten Zecken und 0,1% der wirtssuchenden Zecken am Wald-Standort DNA von *B. capreoli*. Die hohe *B. capreoli*-Prävalenz in Rehen an diesem Standort lässt sich durch eine mögliche Persistenz des Erregers im Rehwirt erklären. Die Dauer solcher potentiell persistierenden Infektionen ist für z.B. *B. divergens* oder *B. bovis* mit einem Zeitraum von bis zu vier Jahren angegeben (Eckert et al., 2008). Es scheint möglich, dass die persistierende *B.*

capreoli-Parasitämie im Rehwirt hoch genug ist, um den Erreger in Blut bzw. Milz der Tiere molekularbiologisch zu bestätigen, die Erregerkonzentration im Blut jedoch zu niedrig ist, um die saugende Zecke nachweislich zu infizieren. Eine weitere Erklärung für den Unterschied zwischen der hohen *B. capreoli*-Prävalenz in den Rehen und niedrigen Prävalenz in von diesen abgesammelten Zecken könnte eine fast ununterbrochene, aber geringgradige Parasitämie der Rehe sein. Dieses Phänomen ist bei Weidetieren in hochendemischen Gebieten nach mehrmaliger Infektion zu beobachten. Die Tiere entwickeln eine sogenannte „infektiongebundene Immunität“, welche partiell eine alimentäre Infektion des Zeckenvektors verhindert, jedoch auf eine bestehende Infektion der Zecke keinen Einfluss hat (Eckert et al., 2008). Aufgrund der geringen *B. capreoli*-Prävalenz in den wirtssuchenden *I. ricinus* (0,1%) am Wald-Standort kann dieser Standort allerdings nicht als ein „Hochendemiegebiet“ bezeichnet werden, was gegen diese Begründung für den Unterschied zwischen der gefundenen hohen *B. capreoli*-Prävalenz in den Rehen und andererseits niedrigen *B. capreoli*-Prävalenz in von diesen abgesammelten gesaugten Zecken spricht. Als weitere mögliche Ursache der hohen *B. capreoli*-Prävalenz in den Rehen kann ein potentieller zusätzlicher Übertragungsweg von *B. capreoli* zwischen den Individuen einer Rehpopulation nicht ausgeschlossen werden. So scheint die transplazentare Übertragung von *B. capreoli* denkenswert zu sein, wie sie auch schon für die Übertragung von *B. gibsoni* in Hunden gezeigt wurde (Fukumoto et al., 2005). Überraschenderweise zeigten über 60% der Sequenzen aus *Babesia* spp.-positiven gesaugten Zecken von Rehwild 100% Übereinstimmung mit *B. microti* strain Jena/Germany (Beck et al., 2011; Duh et al., 2003; Hildebrandt et al., 2007; Silaghi et al., 2012b; Zamoto et al., 2004). Die Infektion der Zecken mit *B. microti* fand aller Wahrscheinlichkeit nach während der Blutmahlzeit als Larve oder Nymphe an einem kleinen Säugetier statt, unter welchen mögliche Reservoir für *B. microti* zu finden sind, bevor die Aufnahme von Rehblut im adulten Zeckenstadium erfolgte.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstützen die Hypothese, dass die Prävalenz von *A. phagocytophilum* und das Vorkommen verschiedener *16S rRNA* Genvarianten dieses Bakteriums von unterschiedlichen Habitat-Eigenschaften und somit auch dem Vorhanden- oder Nichtvorhandensein möglicher Reservoirwirte abhängt. Beim Vergleich der Ergebnisse der vier untersuchten Parkanlagen mit Ergebnissen aus der vorangegangenen Studie (Schorn et al., 2011a) fällt ein kontinuierlicher Rückgang der *A. phagocytophilum*-Prävalenz von 2009 bis 2011 in Nymphen in drei der vier untersuchten Parkanlagen auf. Bei diesem Vergleich muss allerdings die Anwendung unterschiedlicher Sammelstrategien begründet durch unterschiedliche Projektvorgaben in den Jahren 2009/2010 [monatlich von Mai-September (Schorn et al., 2011a)] und 2011/2012 (monatlich von April-Juni) berücksichtigt werden. Im Vergleich der Jahre 2011

und 2012 stieg die *A. phagocytophilum*-Prävalenz in adulten Zecken bzw. Nymphen an jeweils vier unterschiedlichen Standorten aus allen drei Habitaten wieder. Dadurch war die allgemeine durchschnittliche Prävalenz in den gesammelten wirtssuchenden Zecken im Jahr 2012 signifikant höher als im Jahr 2011. Allem Anschein nach beruhen diese Schwankungen, wie die alle Standorte und Habitate übergreifende Abnahme der Prävalenz in Nymphen bis 2011 und die Zunahme der Prävalenz in verschiedenen Zeckenstadien und –geschlechtern im Jahr 2012 nicht nur auf unterschiedlichen Habitateigenschaften oder anderen Faktoren an einzelnen Standorten. Sehr wahrscheinlich sind sie an sich verändernde globale Faktoren, wie die Witterungsverhältnisse während dieser Jahre und das allgemeine Auftreten des Vektors *I. ricinus* und/oder von Reservoirtieren gebunden. Die Prävalenz von *A. phagocytophilum* in wirtssuchenden Nymphen oder adulten *I. ricinus* hängt zeitversetzt direkt von der Prävalenz dieses Erregers in den jeweiligen Reservoirwirten ab. Die wirtssuchenden Zecken, die in dieser Studie gesammelt wurden, hatten ihre letzte Blutmahlzeit höchstwahrscheinlich ein bis zwei Jahre vor der Untersuchung. Somit zeigt die in den Zecken gefundene Prävalenz vermutlich verzögert die Schwankungen der *A. phagocytophilum*-Prävalenz in den Reservoirtieren an. Sowohl in der vorangegangenen Studie (Schorn et al., 2011a) als auch in der vorliegenden konnte eine signifikant höhere *A. phagocytophilum*-Prävalenz in adulten Zecken verglichen mit Nymphen ermittelt werden. Bei ausschließlich transstadialer Übertragungsweise dieses Erregers (Ogden et al., 1998) kann diese Differenz durch die zusätzliche Blutmahlzeit im Stadium als Nymphe erklärt werden. Die von Larven und Nymphen bevorzugte Nahrungsquelle sind kleine Säugetiere wie Mäuse, aber auch auf größeren Säugetieren wie Rehwild können diese Zeckenstadien gefunden werden (Carpi et al., 2008). Zahlreiche Tiere wurden schon als Reservoirwirte für *A. phagocytophilum* in Erwägung gezogen, wobei Rehwild als eines der hauptsächlichen Reservoirtiere angesehen wird. Interessanterweise wurden die niedrigste (Standort B) und die signifikant höchste *A. phagocytophilum*-Prävalenz (Standort R1) im städtischen Habitat gefunden. Standort B ist vergleichsweise die waldähnlichste Parkanlage, während Standort R1 am stärksten kultiviert ist und die Auswahl an möglichen Reservoirwirten im Vergleich dort wesentlich geringer sein könnte. Dieses Ergebnis innerhalb der untersuchten Parkanlagen ähnelt dem Ergebnis einer vorangegangenen Studie, in welcher die Prävalenz von *A. phagocytophilum* in Parkanlagen signifikant höher war als in Waldgebieten (Silaghi et al., 2008a). Die *A. phagocytophilum*-Prävalenz in wirtssuchenden *I. ricinus* aus dem Wald-Standort (5,1%) in der vorliegenden Studie liegt nur gering unter der durchschnittlich gefundenen Prävalenz in wirtssuchenden *I. ricinus* der in diesem Zeitraum untersuchten Parkanlagen (6,1%) und sogar etwas über der mittleren *A. phagocytophilum*-Prävalenz (4,3%) in >20.000 von 1998-2010 untersuchten *I. ricinus* in Deutschland [Übersichtstabelle dargestellt in (Silaghi et al.,

2012b)]. Die am Wald-Standort nachgewiesene Prävalenz war jedoch auch niedriger als die Anzahl positiv getesteter *I. ricinus* der vorangegangenen Studie aus Parkanlagen in Deutschland (6,6-9,5%) (Schorn et al., 2011a). Im Vergleich zum städtischen Habitat und dem Wald-Standort war die *A. phagocytophilum*-Prävalenz wirtssuchender Zecken auf der Weide signifikant niedriger. In diesem Habitat sind Rinder vermutlich die hauptsächliche Blutquelle für Zecken, da die Weide weniger Schutz für Wildtiere bietet als der diese umgebende Wald. Möglicherweise kommt es durch diese Rinder als zusätzliche Blutquelle zu einem Verdünnungseffekt der *A. phagocytophilum*-Prävalenz in der auf der Weide vorhandenen Zeckenpopulation.

Eine sehr hohe *A. phagocytophilum*-Prävalenz von 98,9% wurde in Blut- und Milzproben der Rehe entdeckt, aber auch in Hautproben dieser Tiere war das Bakterium nachweisbar. Während des Stiches der Zecke entsteht eine Läsion in der Haut des Wirtes und polymorphe neutrophile Granulozyten (PMNs) wandern in dieses Gebiet ein (Herron et al., 2005; Tatchell and Moorhouse, 1970). *A. phagocytophilum* zeigt besondere Affinität zu Neutrophilen (Carlyon and Fikrig, 2003; Chen et al., 1994) und wurde bereits in einer vorangegangenen Studie in polymorphen neutrophilen Granulozyten und Makrophagen aus Hautbiopsien von Lämmern gefunden (Granquist et al., 2010). Studien in der Vergangenheit haben gezeigt, dass sich die gefundene Anzahl *A. phagocytophilum* positiver Rehe in Europa im Mittel zwischen 18.4 % und 94.0 % bewegt (Liz et al., 2002; Oporto et al., 2003; Petrovec et al., 2003; Polin et al., 2004; Scharf et al., 2011; Silaghi et al., 2011b; Skarphéðinsson et al., 2005; Stefanidesova et al., 2008). Die am Wald-Standort ermittelte Prävalenz in Rehwild bestätigt die in einer früheren Studie gefundene sehr hohe Zahl positiv getesteter Tiere aus derselben Region (Silaghi et al., 2011d). Verglichen mit anderen europäischen Studien ist die in der vorliegenden Arbeit gefundene sehr hohe *A. phagocytophilum*-Prävalenz möglicherweise teilweise in der hohen Sensitivität der angewandten Real-Time PCR-Methode begründet [0,125-125 *A. phagocytophilum*-infizierte HL-60 Zellen (Ct-Werte 20,6-32,6)] (Courtney et al., 2004). In den meisten vergleichbaren früheren Arbeiten wurde dagegen eine konventionelle PCR-Methode mit vermutlich geringerer Sensitivität zum Nachweis von *A. phagocytophilum* angewandt. Durch die hohe Sensitivität der Real-Time PCR ist der Nachweis von *A. phagocytophilum* auch in Proben mit geringerer Pathogenkonzentration möglich, welche eventuell beim Nachweis mit einer konventionellen PCR-Methode „falsch negativ“ detektiert werden. Die hohe Anzahl *A. phagocytophilum* positiver Rehe ist ein Hinweis auf die mögliche Reservoirrolle von Rehwild für dieses Bakterium. Dieses Indiz einer möglichen Reservoirfunktion von Rehen für *A. phagocytophilum* wird durch die Tatsache unterstützt, dass im Gegensatz zu gerade einmal 7,9% positiv gefundenen wirtssuchenden adulten Zecken am untersuchten Wald-Standort, ein positiver DNA Nachweis in 86,1% der gesaugten adulten Zecken nach Aufnahme erregerrhaltigen Rehblutes möglich war.

Die biologischen Ursachen dieser außerordentlich hohen Positivität der Rehe für *A. phagocytophilum* am Wald-Standort sollte Ziel zukünftiger Studien sein.

In der vorliegenden Arbeit wurden 11 verschiedene partielle *16S rRNA* Genvarianten in unterschiedlichen *A. phagocytophilum*-positiven Proben von wirtssuchenden Zecken, Rehen und von Rehen abgesammelten Zecken gefunden. Im folgenden Text werden diese partiellen *16S rRNA* Genvarianten abgekürzt als „Genvarianten“ mit Großbuchstaben (siehe Publikation 1 und 2) bezeichnet. Eine grundlegende Einteilung der verschiedenen Genvarianten in „Wildwiederkäuer assoziiert“ bzw. „mit domestizierten Tieren assoziiert“ oder „beiden Gruppen zugehörig“ wurde kürzlich diskutiert (Silaghi et al., 2011b; e; 2012a). Das Auftreten der gefundenen Genvarianten von *A. phagocytophilum* variierte in wirtssuchenden *I. ricinus* an den unterschiedlichen Standorten. In den Parkanlagen R1 und M2 wurde überwiegend die Genvariante ‘A’ in *A. phagocytophilum*-positiven *I. ricinus* gefunden. *A. phagocytophilum* mit dieser Genvariante wurde als womöglich „mit domestizierten Tieren assoziiert“ beschrieben (Silaghi et al., 2011b; e; 2012a). Dieses Ergebnis bestätigt die an diesen Standorten in den Jahren 2009/2010 gefundenen Genvariante in *A. phagocytophilum*-positiven *I. ricinus* (Schorn et al., 2011a). Da Wildwiederkäuer selten bzw. gar nicht an den Standorten R1 und M2 zu finden sind und diese Genvariante bisher auch nicht in *A. phagocytophilum* in Wildwiederkäuern gefunden wurde, müssen andere Tiere wie Vögel [von welchen zahlreiche Arten in der Parkanlage R1 heimisch sind (Stadt Regensburg Umweltreferat-Gartenamt, 1996)], Mäuse, Füchse oder Igel als Reservoir für *A. phagocytophilum* mit dieser Genvariante dienen (Franke et al., 2010; Liz et al., 2000; Petrovec et al., 2003; Silaghi et al., 2012a). Die Aussagen vorangegangener Studien bezüglich der Reservoirkompetenz von Vögeln für *A. phagocytophilum* sind widersprüchlich. So wurde diese einerseits für möglich gehalten, andererseits aber verneint (Daniels et al., 2002; Skotarczak et al., 2006). Auch Hunde wurden schon als geeignetes Reservoir in Stadtgebieten diskutiert (Jensen et al., 2007; Kohn et al., 2011; Schorn et al., 2011a) und *A. phagocytophilum* mit der Genvariante ‘A’ wurde bereits in Hunden in früheren Studien nachgewiesen (Silaghi et al., 2011e). Diese Tiere zählen in der vorliegenden Studie aufgrund des geringen Vorkommens an Wildtieren in den Parkanlagen R1 und M2 zu den potentiellen Reservoirwirten für *A. phagocytophilum* mit der Genvariante ‘A’. *A. phagocytophilum* mit dieser Genvariante wurde vormals als ursächlich für granulozytäre Anaplasiose bei einem erkrankten Menschen (Scharf et al., 2011), Pferden und Hunden beschrieben (Silaghi et al., 2011e; 2011f), erst kürzlich jedoch wurde eine mögliche geringere Pathogenität von *A. phagocytophilum* mit dieser Genvariante verglichen mit anderen Genvarianten diskutiert (Silaghi et al., 2011e). Eine reduzierte Pathogenität würde die vorhandene Diskrepanz zwischen der hohen Prävalenz in wirtssuchenden Zecken in den untersuchten Parkanlagen und den fehlenden klinischen Erkrankungsfällen in der

Bevölkerung erklären. Weiterführende experimentelle Studien, die sich mit der Pathogenität von *A. phagocytophilum* mit verschiedenen Genvarianten befassen, sind zur besseren Erklärung dieser Hypothese notwendig. Auch sind weitere Untersuchungen notwendig, um das Reservoir für *A. phagocytophilum* in Stadtgebieten zu finden. In der Parkanlage M3 (die ebenso hoch von Besuchern frequentiert ist, aber in welcher diese die Wege nicht verlassen dürfen, die Grasflächen selten gemäht werden und Hunde an der Leine zu führen sind) sind Rehpopulationen vorhanden, und neben der Genvariante 'A' wurde auch Genvariante 'Y' in *A. phagocytophilum*-positiven wirtssuchenden Zecken nachgewiesen. Diese Genvariante wurde bereits in *A. phagocytophilum*-positiven Rehwildproben gefunden (Scharf et al., 2011; Silaghi et al., 2011b) und als vermutlich „Wildwiederkäuer assoziiert“ beschrieben (Silaghi et al., 2011b; e; 2012a). *A. phagocytophilum* mit der Genvariante 'Y' wurde auch an anderen Standorten entdeckt, an denen Wildwiederkäuer heimisch sind, wohingegen es nicht in Parkanlagen ohne einem Vorkommen dieser Tiere ermittelt werden konnte. Diese Ergebnisse bestätigen die Ergebnisse von 2009/2010 (Schorn et al., 2011a). Auf der Weide, auf welcher hauptsächlich Rinder gehalten werden, wurden in *A. phagocytophilum*-positiven wirtssuchenden *I. ricinus* zusätzlich zur eben genannten Genvariante 'Y', die Genvarianten 'B' und 'W' gefunden. Diese wurden als „beiden Gruppen zugehörig“ (Wildwiederkäuer und domestizierte Tiere) diskutiert (Silaghi et al., 2011b; e; 2012a). Die Genvariante 'B' ist im amplifizierten Genstück identisch der Genvariante des Prototypen von *A. phagocytophilum*, die im Zusammenhang mit menschlichen Erkrankungsfällen beschrieben wurde (Chen et al., 1994) und ist ebenso in *A. phagocytophilum* aus an Anaplasmosen erkrankten Pferden und Hunden zu finden (Silaghi et al., 2011e; f). Diese Genvariante wurde auch schon in *A. phagocytophilum*-positiven Wildschweinen, Igel und Wildwiederkäuern entdeckt und scheint nicht speziesspezifisch zu sein (Michalik et al., 2012; Silaghi et al., 2012a; Zeman and Pecha, 2008). *A. phagocytophilum* mit Genvariante 'W' wurde bis jetzt hauptsächlich in an Zeckenfieber erkrankten Rindern und Schafen in vorangegangenen Studien nachgewiesen (Nieder et al., 2012; Scharf et al., 2011; Stuenkel et al., 2002). Diese Genvariante konnte auch in *A. phagocytophilum* positiven kleinen Säugetieren (Rar et al., 2011), Bisons (*Bison bonasus*), Rotwild (Scharf et al., 2011), Gämsen (*Rupicapra rupicapra*) und Mufflons (*Ovis orientalis musimon*) (Silaghi et al., 2011b) gefunden werden. In *A. phagocytophilum*-positiven wirtssuchenden Zecken aus dem Wald war die zweithäufigste gefundenen Genvariante neben 'Y' die Genvariante 'X'. Diese konnte auch in *A. phagocytophilum*-positiven wirtssuchenden Zecken von der Weide und der Wald-ähnlichen Parkanlage B amplifiziert werden und gilt wie Genvariante „Y“ als „Wildwiederkäuer assoziiert“ (Silaghi et al., 2011b; e; 2012a).

In Rehen dieser Studie und in von diesen abgesammelten Zecken konnten ebenso verschiedene Genvarianten des *16S rRNA* Teilstücks von *A. phagocytophilum* bestimmt werden. Die Mehrzahl der gefundenen Sequenzen (Genvariante 'X', 'Y' und 'I') wurde in vorangegangenen Studien überwiegend mit *A. phagocytophilum* aus Wildwiederkäuern wie Rehen in Verbindung gebracht [Genvariante 'X', 'Y' (Silaghi et al., 2011b; f), Genvariante 'I' (Liz et al., 2002)]. *A. phagocytophilum* mit Genvarianten 'V' und 'W' wurde in dieser Arbeit in jeweils einem Reh und zwei bzw. einer gesaugten Zecke nachgewiesen. Genvariante 'V' wurde bereits in *A. phagocytophilum*-positiven Proben aus Rehen und Schafen nachgewiesen (Scharf et al., 2011), Genvariante 'W', wie im vorigen Absatz erwähnt, in *A. phagocytophilum*-positiven Rindern und Schafen (Nieder et al., 2012; Stuen et al., 2002).

Der molekularbiologische Nachweis verschiedener partieller *16S rRNA* Genvarianten von *A. phagocytophilum* aus *I. ricinus*-Zecken und Rehproben aus unterschiedlichen Habitaten mit variierenden Vorkommen an potentiellen Reservoirwirten bekräftigt die Hypothese einer möglichen Assoziation von genetisch variierenden *A. phagocytophilum* mit Wildwiederkäuern bzw. domestizierten Tieren oder beiden Gruppen. Zur Bestätigung dieser Hypothese ist die Durchführung gezielter Infektionsversuche notwendig. In diesen kann die möglicherweise vorhandene oder abwesende Pathogenität genetisch variierender *A. phagocytophilum* in den jeweiligen Tiergruppen getestet werden. Derartige Infektionsversuche sollten Ziel zukünftiger Studien sein.

Die *Rickettsia* spp.-Prävalenz in wirtssuchenden Zecken in den vier untersuchten Parkanlagen im Jahr 2011 war (wie die *Babesia* spp.-Prävalenz) vergleichbar der an diesen Standorten in einer vorangegangenen Studie im Jahr 2009 ermittelten Prävalenz (Schorn et al., 2011b). In der vorliegenden Arbeit wurde eine signifikant höhere *Rickettsia* spp.-Prävalenz im Wald und der Weide verglichen zu den Parkanlagen gefunden. Dies entspricht den Ergebnissen einer früheren Studie, in welcher eine signifikant geringere *Rickettsia* spp.-Prävalenz in Parkanlagen verglichen mit Waldgebieten gefunden wurde (Silaghi et al., 2008b). Die *Rickettsia* spp.-Prävalenz in den gesammelten wirtssuchenden Nymphen und adulten *I. ricinus* vom Wald-Standort war mit einem durchschnittlichen Wert von 16% höher, als Prävalenzen zwischen 1,4%-14,7% aus Studien in anderen Waldgebieten in Europa aus den Jahren 2010-2012 (Cotté et al., 2010; Hildebrandt et al., 2010a; Lommano et al., 2012; Reis et al., 2011; Subramanian et al., 2012). Interessanterweise zeigte ein dem untersuchten Wald nahegelegenes Waldgebiet in einer vorangegangenen Studie eine vergleichsweise hohe Prävalenz [Standort W in (Silaghi et al., 2008b)]. Auch beim Vergleich der *Rickettsia* spp.-Prävalenz in wirtssuchenden Zecken aus dieser Studie mit den Ergebnissen anderer Forschungsarbeiten müssen unterschiedliche Nachweismethoden

berücksichtigt werden, die möglicherweise Schwankungen in der beschriebenen Prävalenz begründen. Die niedrigste *Rickettsia* spp.-Prävalenz in der vorliegenden Arbeit wurde wie für *Babesia* spp. in den zwei stärker kultivierten Parkanlagen gefunden. Jedoch wurden trotz der in Parkanlagen geringeren Prävalenz sogar in der flächenmäßig kleinsten Parkanlage (R1) bis zu 5,4% der gesammelten adulten wirtssuchenden Zecken positiv auf *Rickettsia* spp. getestet. Da in diesem Park zahlreiche Vogelarten heimisch sind (Stadt Regensburg Umweltreferat-Gartenamt, 1996), sollten auch diese Tiere als mögliches Reservoir für *Rickettsia* spp. in Stadtgebieten in Erwägung gezogen werden. Das Reservoirpotential dieser Tiere für *Rickettsia* spp. wurde in vorangegangenen Studien bereits für möglich erachtet (Santos-Silva et al., 2006) bzw. zurückgewiesen (Stańczak et al., 2009).

In keiner der untersuchten Wildtierproben konnte DNA von *Rickettsia* spp. nachgewiesen werden und eine vergleichbare Prävalenz in gesaugten und wirtssuchenden Zecken aus dem Wald-Standort wurde ermittelt. Dieses Ergebnis ist vergleichbar den Ergebnissen früherer Studien, in denen kein Zusammenhang zwischen Wildwiederkäuern als möglichem Reservoir und *R. helvetica* gefunden werden konnte (Skarphéðinsson et al., 2005; Stańczak et al., 2009; Stefanidesova et al., 2008).

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Rehe waren zu 33,7% positiv auf DNA von *Bartonella* spp.. Die gefundenen Sequenzen zeigten verglichen mit Sequenzen aus der GenBank höchste Ähnlichkeit (97-100%) zu *Bartonella schönbuchensis*, welches vermutlich durch Lausfliegen übertragen wird (Halos et al., 2004). Eine exakte Zuordnung der in dieser Studie gefundenen *Bartonella*-Spezies war jedoch nicht möglich. Neben Ähnlichkeit zu *Bartonella schönbuchensis*, zeigten diese Sequenzen ebenso 96-97% Übereinstimmung zu *Bartonella capreoli* Sequenzen aus einem Reh in Frankreich (Bermond et al., 2002). In einer nordamerikanischen Studie wurden *Bartonella* spp. mit 15% in Rothirschen (*Cervus elaphus*) und bis zu 90 % in Maultierhirschen (*Odocoileus hemionus*) in wildlebenden und domestizierten Wiederkäuern gefunden (Chang et al., 2000). Beschreibungen zur Pathogenität von *Bartonella schönbuchensis*, *Bartonella capreoli* oder *Bartonella chomelii* wurden nicht gefunden, aber es scheint möglich zu sein, dass wildlebende und domestizierte Wiederkäuer als Reservoir für bestimmte *Bartonella*-Spezies dienen. Die Frage, ob diese mögliche Reservoirfunktion irgendeine Auswirkung auf die Gesundheit von Mensch und Tier hat, bleibt zunächst offen.

In 2011 wurde eine sehr hohe Zeckendichte an vier von sechs und eine hohe und mittlere Zeckendichte an jeweils einem Standort gemessen, wohingegen in 2012 nur an einem Standort eine sehr hohe, aber an fünf Standorten eine mittlere Zeckendichte ermittelt werden konnte (Schwarz et al., 2009). Ein auffallender Unterschied der Zeckendichte bezogen auf die

verschiedenen Habitats konnte nicht festgestellt werden. Der Anstieg des Verhältnisses von adulten Zecken zu Nymphen an allen Standorten in 2012 verglichen mit 2011 kann momentan nicht ausreichend erklärt werden. Dieses Phänomen wurde nicht nur in dieser Studie, sondern auch in Untersuchungen anderer Forschergruppen beobachtet. So wurden an einem Standort in der Nähe von Amberg (Gemeinde Kümmerbruck, Landkreis Amberg-Weizsach, Deutschland) im Jahr 2011 deutlich mehr Nymphen als adulte Zecken gefunden, wohingegen im Jahr 2012 die Differenz zwischen den gefundenen Zeckenstadien minimal war und annähernd ebenso viele Nymphen wie Adulte vorhanden waren (Dobler G., persönliche Mitteilung). Das Klima und die Wetterverhältnisse, wie Temperatur, Luftfeuchtigkeit, Regen- und Windverhältnisse, können die Aktivität der Zecken bei der Wirtssuche und somit indirekt die Übertragung von Pathogenen und die zu findende Prävalenz beeinflussen (Estrada-Peña et al., 2012; Li et al., 2012). Die Schwankungen der Prävalenz der untersuchten Erreger an unterschiedlichen Standorten konnte nicht mit den ermittelten Schwankungen in der Zeckendichte in Zusammenhang gebracht werden. Eine Erklärung hierfür könnten saisonale Schwankungen oder verschiedene Sammelzeitpunkte in den Jahren 2009/2010 (Mai-September) und 2011/2012 (April-Juni) sein. Der Standort mit der höchsten Zeckendichte/100m² in beiden Jahren und einem sehr hohen Zeckenaufkommen verglichen mit der Einteilung nach Schwarz (Schwarz et al., 2009) war die Parkanlage R1. Die geringe Größe dieses im Zentrum von Regensburg gelegenen Parks, die diesen umgebende Mauer und das dort vorhandene dichte Unterholz scheinen den verschiedenen Stadien der Zecken besonderen Schutz vor Umwelteinflüssen zu bieten (Estrada-Peña et al., 2012). Ein gehäuftes Auftreten bestimmter Wirtstiere an diesem Standort ist nicht bekannt. Es ist jedoch durchaus denkenswert, dass die geringe Größe dieser Parkanlage die Wahrscheinlichkeit zwischen einem Zusammentreffen der vorhandenen *I. ricinus* und einem potentiellen Wirt als Nahrungsquelle erhöht und somit zu dieser beständig sehr hohen Zeckendichte führt.

Die Prävalenz der in dieser Studie untersuchten, für den Menschen potentiell pathogenen Erregerspezies in wirtssuchenden *I. ricinus* lässt die von diesen für die Bevölkerung ausgehende Gefährdung relativ gering erscheinen. Dennoch sollte bedacht werden, dass diese potentiell pathogenen Erreger (*B. microti*, *Babesia* sp. EU1, *A. phagocytophilum*, *R. helvetica*, *R. monacensis*) in *I. ricinus* inzwischen auch in unseren Breitengraden verbreitet sind. Der Stich einer Zecke birgt somit für Mensch und Tier ein potentielles Risiko an einer zeckenübertragenen Infektion zu erkranken. Gerade Bevölkerungsgruppen, wie Jäger, Waldarbeiter und z.B. Hundebesitzer, die viel Zeit in der freien Natur auch abseits der Wege verbringen, sollten sich dieser latenten Gefahr bewusst sein und Zeckenprophylaxe anwenden, um das Risiko einer Infektion durch eine zeckenübertragene Erkrankung zu minimieren.

VI. SCHLUSSFOLGERUNG

Abschließend lässt sich sagen, dass die variierende Prävalenz von *Babesia* spp., *A. phagocytophilum* und *Rickettsia* spp. und das Auftreten verschiedener Spezies bzw. Genvarianten dieser Erreger in Parkanlagen, auf der Weide und im Wald höchstwahrscheinlich in Zusammenhang mit variierenden Habitatstrukturen steht. Ein Zusammenhang zwischen Zeckendichte und dem Auftreten der untersuchten zeckenübertragenen Erreger konnte nicht hergestellt werden. Die verschiedenen Habitate bieten unterschiedliche Umgebungsbedingungen für Zeckenpopulationen und stellen variierende Lebensräume für potentielle Reservoirwirte dar. Auch mögliche Beeinflussung dieser Habitate durch den Kontakt zwischen Zecken, potentiellen Reservoirwirten, Mensch und domestizierten Tieren sind zu berücksichtigen. Somit scheinen in Abhängigkeit der Habitatstruktur und dadurch verfügbarer Reservoirwirte unterschiedliche Prävalenzen und Erregervarianten in verschiedenen Habitaten aufzutreten.

Überzeugende Hinweise für eine mögliche Reservoirfunktion von Rehwild für *B. capreoli* und *A. phagocytophilum* mit spezifischen, sich partiell unterscheidenden *16S rRNA* Genvarianten konnten gefunden werden. Außerdem könnte Rehwild einen potentiellen Reservoirwirt für bestimmte *Bartonella* spp. darstellen. Eine Bedeutung von Rehwild als möglichem Wirt für *Rickettsia* spp. konnte in dieser Studie nicht ermittelt werden.

Zukünftig sollte neben der weiteren und langfristigen Untersuchung der Prävalenz dieser Erreger in wirtssuchenden Zecken aus verschiedenen Habitaten das Augenmerk auf die Untersuchung und Identifikation vorhandener möglicher Reservoirwirte gelegt werden. Die Verbreitung von *I. ricinus* und für den Menschen potentiell pathogener Erregervarianten können so ermittelt und eventuelle Erkrankungsrisiken für die Bevölkerung frühzeitig abgeschätzt werden.

VII. ZUSAMMENFASSUNG

Verschiedene Zeckenhabitate bieten durch sich unterscheidende Habitatstrukturen und der An- bzw. Abwesenheit möglicher Reservoirwirte voneinander divergierende Lebensbedingungen für *I. ricinus* Zecken. In den Monaten April, Mai und Juni der Jahre 2011 und 2012 wurden an 6 Standorte aus 3 verschiedenen Habitaten (Parkanlagen, Weide, Wald) wirtssuchende Zecken von der Vegetation mit der Flaggmethode gesammelt und die Zeckendichte/100m² bestimmt. Mittels konventioneller und Real-Time PCR wurden die Proben auf DNA von *Babesia* spp., *A. phagocytophilum* und *Rickettsia* spp. (nur 2011) untersucht. Des Weiteren wurden Rehe aus dem Wald und von diesen abgesammelte Zecken auf die genannten Pathogene untersucht. Rehe wurden zusätzlich auf *Bartonella* spp. getestet. Anschließend wurden die Spezies und Genvarianten mittels Sequenzanalyse und Vergleich mit der Gendatenbank ermittelt. Insgesamt wurden 10.303 wirtssuchende *I. ricinus* gefangen und 557 adulte *I. ricinus* von 95 Rehen abgesammelt. Die ermittelte Zeckendichte betrug je nach Standort und Jahr zwischen 15-97 Zecken/100m² in den Parkanlagen, 38-50 Zecken/100m² auf der Weide und 34-73 Zecken/100m² am Wald-Standort. Beispielfhaft wurden 4.381 wirtssuchende *I. ricinus* (4.064 für *A. phagocytophilum* ohne Larven), 95 Rehe und 331 gesaugte *I. ricinus* untersucht. Die durchschnittliche Prävalenz der Proben betrug 2011 bzw. 2012: ***Babesia* spp.**: wirtssuchenden Zecken: Parkanlagen: 0,2% bzw. 0,9%; Weide: 1,9% bzw. 1,1%; Wald: 1,8% bzw. 3,1-4,9% (inkl. 2 Larvenpools mit 10 Larven); Rehe: 89,5%; gesaugte Zecken: 7,3%; ***A. phagocytophilum***: wirtssuchenden Zecken: Parkanlagen: 4,9% bzw. 7,4%; Weide: 1,1% bzw. 2,8%; Wald: 4,0% bzw. 5,8%; Rehe: 98,9%; gesaugte Zecken: 86,1%; ***Rickettsia* spp.** wirtssuchenden Zecken Parkanlagen: 7,0-7,4% (inkl. 4 Larvenpools mit 14 Larven); Weide: 14,2%; Wald: 10,4-13,6% (inkl. 3 Larvenpools mit 14 Larven); Rehe: 0%; gesaugte Zecken: 16,6% ; ***Bartonella* spp.**: Rehe: 33,7%.

B. capreoli und *Babesia* sp. EU1 wurden in wirtssuchenden Zecken, Rehen und gesaugten Zecken gefunden, *B. microti* strain Jena/Germany dagegen nur in wirtssuchenden und gesaugten Zecken. Insgesamt wurden 11 verschiedene 16S rRNA Genvarianten von *A. phagocytophilum* nachgewiesen. Die Sequenzierung der *Rickettsia* spp.-PCR-Produkte ergab in wirtssuchenden Zecken *R. helvetica* (98%) und *R. monacensis* strain/IR Munich (2%), in den gesaugten Zecken ausschließlich *R. helvetica*. Die *Bartonella* spp.-Sequenzen aus den Rehproben zeigten Ähnlichkeiten zu *Bartonella schoenbuchensis*, *Bartonella capreoli* und *Bartonella chomelii*. Sowohl die gefundenen Erregerprävalenzen, als auch die ermittelten *Babesia*-Spezies und die zu findenden partiellen 16S rRNA Genvarianten in *A. phagocytophilum* unterscheiden sich bezüglich der Habitate/Standorte. Ein Zusammenhang zwischen der jeweils gefundenen

Erregerprävalenz, den ermittelten Spezies und Genvarianten und der standortabhängigen Verfügbarkeit von Reservoirwirten wird vermutet. Eine Beziehung zwischen Zeckendichte und dem Auftreten der untersuchten zeckenübertragenen Erreger konnte nicht hergestellt werden. Die hohe Prävalenz von *B. capreoli* und einzelner *A. phagocytophilum* 16S rRNA Genvarianten im Reh liefern überzeugende Hinweise auf eine mögliche Reservoirfunktion dieses Wildwiederkäuers für diese Erreger. Hinweise, dass das Reh ein natürliches Reservoir für *Rickettsia* spp. darstellt, konnten in dieser Studie nicht ermittelt werden. Eine Reservoirfunktion von Rehwild für bestimmte *Bartonella* spp. scheint nicht ausgeschlossen zu sein und sollte zukünftig eingehender untersucht werden.

VIII. SUMMARY

Different tick-habitats offer diverging living conditions for *I. ricinus* ticks caused by different habitat structure and the occurrence or absence of possible reservoir hosts. Questing ticks were collected in April, May and June 2011 and 2012 with the flagging method from the vegetation of 6 study sites in 3 different tick-habitats (city parks, pasture, forest). The density of ticks/100m² was measured for each sampling. Samples were tested for DNA of *Babesia* spp., *A. phagocytophilum* and *Rickettsia* spp. (only 2011) by conventional and real-time PCR. Furthermore roe deer samples from the forest site and engorged ticks from these roe deer were investigated for the prevalence of these pathogens; roe deer was additionally screened for *Bartonella* spp.. Afterwards species identification was done with sequence analysis and comparison with GenBank sequences. A total of 10,303 questing *I. ricinus* and 557 adult ticks (*I. ricinus*) from 95 roe deer was collected. The measured tick abundance alternates on different study sites and habitats between 15-97 ticks/100m² in the city parks, 38-50 ticks/100m² on the pasture and 34-73 ticks/100m² in the forest area. Altogether 4,381 questing *I. ricinus* (4,064 for *A. phagocytophilum* without larvae), 95 roe deer and 331 engorged *I. ricinus* were investigated. The average prevalence of the tested samples was in 2011 and 2012 respectively: ***Babesia* spp.:** questing ticks: city parks: 0.2% and 0.9%; pasture: 1.9% and 1.1%; forest: 1.8% and 3.1-4.9% (incl. 2 pools of larvae with 10 larvae); roe deer: 89.5%; engorged ticks: 7.3%; ***A. phagocytophilum*:** questing ticks: city parks: 4.9% and 7.4%; pasture: 1.1% and 2.8%; forest: 4.0% and 5.8%; roe deer: 98.9%; engorged ticks: 86.1%; ***Rickettsia* spp.:** questing ticks: city parks: 7.0-7.4% (incl. 4 pools of larvae with 14 larvae); pasture: 14.2%; forest: 10.4-13.6% (incl. 3 pools of larvae with 14 larvae); roe deer: 0%; engorged ticks: 16.6%; ***Bartonella* spp.:** roe deer: 33.7%.

B. capreoli and *Babesia* sp. EU1 were detected in questing ticks, roe deer and engorged ticks, whereas *B. microti* strain Jena/Germany was only found in tick samples. Sequencing of *A. phagocytophilum* revealed 11 different *16S rRNA* gen variants. *R. helvetica* (98%) and *R. monacensis* strain/IR Munich (2%) were found in questing, *R. helvetica* in engorged ticks. Sequence analysis of *Bartonella* spp. samples from roe deer showed similarity to *Bartonella schoenbuchensis*, *Bartonella capreoli* and *Bartonella chomelii*. Differences in prevalence of the investigated pathogens and the occurrence of *Babesia*-species and *16S rRNA* gen variants of *A. phagocytophilum* were found. These differences are most probably reasoned by varying appearance of reservoir hosts on study sites and tick-habitats. There was no obvious correlation between tick density and prevalence of investigated pathogens. Detection of high prevalence of *B. capreoli* and specific *A. phagocytophilum 16S rRNA* gen variants in roe deer gives strong

evidence that this wild ungulate acts as natural reservoir host for these pathogens. No evidence was found that roe deer acts as reservoir host for *Rickettsia* spp. The reservoir capacity of roe deer for specific *Bartonella* spp. seems to be possible and should be further investigated.

IX. LITERATURVERZEICHNIS

Alberdi M.P., Walker A.R., Urquhart K.A., 2000, Field evidence that roe deer (*Capreolus capreolus*) are a natural host for *Ehrlichia phagocytophila*. Epidemiol Infect 124, 315-323.

Alhumaidan H., Westley B., Esteva C., Berardi V., Young C., Sweeney J., 2013, Transfusion-transmitted anaplasmosis from leukoreduced red blood cells. Transfusion 53, 181-186.

Anderson B.E., Neuman M.A., 1997, *Bartonella* spp. as emerging human pathogens. Clin Microbiol Rev 10, 203-219.

Annen K., Friedman K., Eshoa C., Horowitz M., Gottschall J., Straus T., 2012, Two cases of transfusion-transmitted *Anaplasma phagocytophilum*. Am J Clin Pathol 137, 562-565.

Aureli S., Foley J.E., Galuppi R., Rejmanek D., Bonoli C., Tampieri M.P., 2012, *Anaplasma phagocytophilum* in ticks from parks in the Emilia-Romagna region of northern Italy. Vet Ital 48, 413-423.

Bakken J.S., Dumler J.S., 2006, Clinical diagnosis and treatment of human granulocytotropic anaplasmosis. Ann N Y Acad Sci 1078, 236-247.

Bayerisches Landesamt für Umwelt, 2004, Arten und Biotopschutzprogramm Bayern, ABSP-Landkreisverbände, Stadt-ABSP, München, Stadt, XM3332, www.lfu.bayern.de/natur.

Bayerisches Landesamt für Umwelt, 2007, Arten und Biotopschutzprogramm Bayern, ABSP-Landkreisverbände, Stadt-ABSP, Starnberg, STA222A, www.lfu.bayern.de/natur.

Beck R., Vojta L., Ćurković S., Mrljak V., Margaletić J., Habrun B., 2011, Molecular survey of *Babesia microti* in wild rodents in central Croatia. Vector Borne Zoonotic Dis 11, 81-83.

Bermond D., Boulouis H.J., Heller R., Van Laere G., Monteil H., Chomel B.B., Sander A., Dehio C., Piémont Y., 2002, *Bartonella bovis* Bermond *et al.* sp. nov. and *Bartonella capreoli* sp. nov., isolated from European ruminants. Int J Syst Evol Microbiol 52, 383-390.

Bertolotti L., Tomassone L., Tramuta C., Grego E., Amore G., Ambrogi C., Nebbia P., Mannelli A., 2006, *Borrelia lusitaniae* and spotted fever group *rickettsiae* in *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) in Tuscany, central Italy. J Med Entomol 43, 159-165.

Bezzel E., Geiersberger I., Lossow G.v., Pfeifer R., 2005, Brutvögel in Bayern. Verbreitung 1996 bis 1999. Stuttgart: Verlag Eugen Ulmer 560 S.

Birtles R.J., 2005, Bartonellae as elegant hemotropic parasites. Ann N Y Acad Sci 1063, 270-279.

Bock R., Jackson L., de Vos A., Jorgensen W., 2004, Babesiosis of cattle. Parasitology 129 Suppl, S247-269.

Bonnet S., Jouglin M., L'Hostis M., Chauvin A., 2007, *Babesia* sp. EU1 from roe deer and transmission within *Ixodes ricinus*. Emerg Infect Dis 13, 1208-1210.

Bown K.J., Lambin X., Telford G., Heyder-Bruckner D., Ogden N.H., Birtles R.J., 2011, The common shrew (*Sorex araneus*): a neglected host of tick-borne infections? Vector Borne Zoonotic Dis 11, 947-953.

Brenner D.J., O'Connor S.P., Winkler H.H., Steigerwalt A.G., 1993, Proposals to unify the genera *Bartonella* and *Rochalimaea*, with descriptions of *Bartonella quintana* comb. nov., *Bartonella vinsonii* comb. nov., *Bartonella henselae* comb. nov., and *Bartonella elizabethae* comb. nov., and to remove the family *Bartonellaceae* from the order *Rickettsiales*. Int J Syst Bacteriol 43, 777-786.

Brouqui P., Stein A., Dupont H.T., Gallian P., Badiaga S., Rolain J.M., Mege J.L., La Scola B., Berbis P., Raoult D., 2005, Ectoparasitism and vector-borne diseases in 930 homeless people from Marseilles. Medicine (Baltimore) 84, 61-68.

Burri C., Dupasquier C., Bastic V., Gern L., 2011, Pathogens of emerging tick-borne diseases, *Anaplasma phagocytophilum*, *Rickettsia* spp., and *Babesia* spp., in *Ixodes* ticks collected from rodents at four sites in Switzerland (Canton of Bern). Vector Borne Zoonotic Dis 11, 939-944.

Carlyon J.A., Fikrig E., 2003, Invasion and survival strategies of *Anaplasma phagocytophilum*. Cell Microbiol 5, 743-754.

Carpi G., Cagnacci F., Neteler M., Rizzoli A., 2008, Tick infestation on roe deer in relation to geographic and remotely sensed climatic variables in a tick-borne encephalitis endemic area. Epidemiol Infect 136, 1416-1424.

Casati S., Sager H., Gern L., Piffaretti J.C., 2006, Presence of potentially pathogenic *Babesia* sp. for human in *Ixodes ricinus* in Switzerland. Ann Agric Environ Med 13, 65-70.

CDC, 2012, <http://www.cdc.gov/anaplasmosis/stats/>. Center for Disease Control and Prevention.

Chang C.C., Chomel B.B., Kasten R.W., Heller R.M., Ueno H., Yamamoto K., Bleich V.C., Pierce B.M., Gonzales B.J., Swift P.K., Boyce W.M., Jang S.S., Boulouis H.J., Piémont Y., Rossolini G.M., Riccio M.L., Cornaglia G., Pagani L., Lagatolla C., Selan L., Fontana R., 2000, *Bartonella* spp. isolated from wild and domestic ruminants in North America. Emerg Infect Dis 6, 306-311.

Charrel R.N., Attoui H., Butenko A.M., Clegg J.C., Deubel V., Frolova T.V., Gould E.A., Gritsun T.S., Heinz F.X., Labuda M., Lashkevich V.A., Loktev V., Lundkvist A., Lvov D.V., Mandl C.W., Niedrig M., Papa A., Petrov V.S., Plyusnin A., Randolph S., Süss J., Zlobin V.I., de Lamballerie X., 2004, Tick-borne virus diseases of human interest in Europe. Clin Microbiol Infect 10, 1040-1055.

Chen S.M., Dumler J.S., Bakken J.S., Walker D.H., 1994, Identification of a granulocytotropic *Ehrlichia* species as the etiologic agent of human disease. J Clin Microbiol 32, 589-595.

Chomel B.B., Boulouis H.J., Breitschwerdt E.B., Kasten R.W., Vayssier-Taussat M., Birtles R.J., Koehler J.E., Dehio C., 2009, Ecological fitness and strategies of adaptation of *Bartonella* species to their hosts and vectors. Vet Res 40, 29.

Clopper C.J., Pearson E.S., 1934, The use of confidence or fiducial limits illustrated in the case of the binomial. Biometrika 26, 404-413.

Corrain R., Drigo M., Fenati M., Menandro M.L., Mondin A., Pasotto D., Martini M., 2012, Study on ticks and tick-borne zoonoses in public parks in Italy. *Zoonoses Public Health* 59, 468-476.

Cotté V., Bonnet S., Cote M., Vayssier-Taussat M., 2010, Prevalence of five pathogenic agents in questing *Ixodes ricinus* ticks from western France. *Vector Borne Zoonotic Dis* 10, 723-730.

Courtney J.W., Kostelnik L.M., Zeidner N.S., Massung R.F., 2004, Multiplex real-time PCR for detection of *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi*. *J Clin Microbiol* 42, 3164-3168.

Daniels T.J., Battaly G.R., Liveris D., Falco R.C., Schwartz I., 2002, Avian reservoirs of the agent of human granulocytic ehrlichiosis? *Emerg Infect Dis* 8, 1524-1525.

Dautel H., Dippel C., Kämmer D., Werkhausen A., Kahl O., 2008, Winter activity of *Ixodes ricinus* in a Berlin forest. *Int J Med Microbiol* 298, Supplement 1, 50-54.

de la Fuente J., Massung R.F., Wong S.J., Chu F.K., Lutz H., Meli M., von Loewenich F.D., Grzeszczuk A., Torina A., Caracappa S., Mangold A.J., Naranjo V., Stuen S., Kocan K.M., 2005a, Sequence analysis of the *msp4* gene of *Anaplasma phagocytophilum* strains. *J Clin Microbiol* 43, 1309-1317.

de la Fuente J., Naranjo V., Ruiz-Fons F., Hofle U., Fernandez De Mera I.G., Villanua D., Almazan C., Torina A., Caracappa S., Kocan K.M., Gortazar C., 2005b, Potential vertebrate reservoir hosts and invertebrate vectors of *Anaplasma marginale* and *A. phagocytophilum* in central Spain. *Vector Borne Zoonotic Dis* 5, 390-401.

Dehio C., Sander A., 1999, *Bartonella* as emerging pathogens. *Trends Microbiol* 7, 226-228.

Dehio C., Lanz C., Pohl R., Behrens P., Bermond D., Piémont Y., Pelz K., Sander A., 2001, *Bartonella schoenbuchii* sp. nov., isolated from the blood of wild roe deer. *Int J Syst Evol Microbiol* 51, 1557-1565.

Dehio C., 2005, *Bartonella*-host-cell interactions and vascular tumour formation. Nat Rev Microbiol 3, 621-631.

Dickman C.R., Doncaster C.P., 1987, The Ecology of Small Mammals in Urban Habitats. I. Populations in a Patchy Environment. J Anim Ecol 56, 629-640.

Dobler G., Abt. für Virologie und Rickettsiologie am Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr, München, persönliche Mitteilung

Dobler G., Wölfel R., 2009, Typhus and other rickettsioses: emerging infections in Germany. Dtsch Ärztebl Int 106, 348-354.

Doudier B., Olano J., Parola P., Brouqui P., 2010, Factors contributing to emergence of *Ehrlichia* and *Anaplasma* spp. as human pathogens. Vet Parasitol 167, 149-154.

Duh D., Petrovec M., Trilar T., Avsic-Zupanc T., 2003, The molecular evidence of *Babesia microti* infection in small mammals collected in Slovenia. Parasitology 126, 113-117.

Duh D., Petrovec M., Bidovec A., Avsic-Zupanc T., 2005, Cervids as *Babesia* hosts, Slovenia. Emerg Infect Dis 11, 1121-1123.

Dumler J.S., Barbet A.F., Bekker C.P., Dasch G.A., Palmer G.H., Ray S.C., Rikihisa Y., Rurangirwa F.R., 2001, Reorganization of genera in the families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order *Rickettsiales*: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. Int J Syst Evol Microbiol 51, 2145-2165.

Dumler J.S., Choi K.S., Garcia-Garcia J.C., Barat N.S., Scorpio D.G., Garyu J.W., Grab D.J., Bakken J.S., 2005, Human granulocytic anaplasmosis and *Anaplasma phagocytophilum*. Emerg Infect Dis 11, 1828-1834.

- Dumler J.S., Madigan J.E., Pusterla N., Bakken J.S., 2007, Ehrlichioses in humans: epidemiology, clinical presentation, diagnosis, and treatment. Clin Infect Dis 45 Suppl 1, S45-51.
- Eckert J., Friedhoff K.T., Zahner H., Deplazes P., 2008, Lehrbuch der Parasitologie für die Tiermedizin, 2. Aufl. Edition. Enke Verlag in MVS Medizinverlage Stuttgart GmbH&Co. KG, Stuttgart.
- Egyed L., Élő P., Sréter-Lancz Z., Széll Z., Balogh Z., Sréter T., 2012, Seasonal activity and tick-borne pathogen infection rates of *Ixodes ricinus* ticks in Hungary. Ticks Tick Borne Dis 3, 90-94.
- Estrada-Peña A., Ayllón N., de la Fuente J., 2012, Impact of climate trends on tick-borne pathogen transmission. Front Physiol 3, 64.
- Fisher R.A., 1935, The logic of inductive inference. J R Stat Soc Series A 98, 39-54.
- Foggie A., 1951, Studies on the infectious agent of tick-borne fever in sheep. J Pathol Bacteriol 63, 1-15.
- Foley J.E., Nieto N.C., Massung R., Barbet A., Madigan J., Brown R.N., 2009, Distinct ecologically relevant strains of *Anaplasma phagocytophilum*. Emerg Infect Dis 15, 842-843.
- Fournier P.E., Grunnenberger F., Jaulhac B., Gastinger G., Raoult D., 2000, Evidence of *Rickettsia helvetica* infection in humans, eastern France. Emerg Infect Dis 6, 389-392.
- Fournier P.E., Raoult D., 2009, Current knowledge on phylogeny and taxonomy of *Rickettsia* spp. Ann N Y Acad Sci 1166, 1-11.
- Franke J., Fritsch J., Tomaso H., Straube E., Dorn W., Hildebrandt A., 2010, Coexistence of pathogens in host-seeking and feeding ticks within a single natural habitat in Central Germany. Appl Environ Microbiol 76, 6829-6836.

Franke J., Hildebrandt A., Meier F., Straube E., Dorn W., 2011, Prevalence of Lyme disease agents and several emerging pathogens in questing ticks from the German Baltic coast. *J Med Entomol* 48, 441-444.

Fukumoto S., Suzuki H., Igarashi I., Xuan X., 2005, Fatal experimental transplacental *Babesia gibsoni* infections in dogs. *Int J Parasitol* 35, 1031-1035.

Garcia-Sanmartin J., Aurtenetxe O., Barral M., Marco I., Lavin S., Garcia-Pérez A.L., Hurtado A., 2007, Molecular detection and characterization of piroplasms infecting cervids and chamois in Northern Spain. *Parasitology* 134, 391-398.

Gigandet L., Stauffer E., Douet V., Rais O., Moret J., Gern L., 2011, Prevalence of three zoonotic *Babesia* species in *Ixodes ricinus* (Linne, 1758) nymphs in a suburban forest in Switzerland. *Vector Borne Zoonotic Dis* 11, 363-366.

Goethert H.K., Telford S.R., 3rd, 2003, What is *Babesia microti*? *Parasitology* 127, 301-309.

Gokce H.I., Woldehiwet Z., 1999, Differential haematological effects of tick-borne fever in sheep and goats. *Zentralbl Veterinarmed B* 46, 105-115.

Granquist E.G., Aleksandersen M., Bergström K., Dumler S.J., Torsteinbø W.O., Stuen S., 2010, A morphological and molecular study of *Anaplasma phagocytophilum* transmission events at the time of *Ixodes ricinus* tick bite. *Acta Vet Scand* 52, 43.

Gray J.S., 2006, Identity of the causal agents of human babesiosis in Europe. *Int J Med Microbiol* 296 Suppl 40, 131-136.

Halos L., Jamal T., Maillard R., Girard B., Guillot J., Chomel B., Vayssier-Taussat M., Boulouis H.J., 2004, Role of *Hippoboscidae* flies as potential vectors of *Bartonella* spp. infecting wild and domestic ruminants. *Appl Environ Microbiol* 70, 6302-6305.

Halos L., Jamal T., Maillard R., Beugnet F., Le Menach A., Boulouis H.J., Vayssier-Taussat M., 2005, Evidence of *Bartonella* sp. in questing adult and nymphal *Ixodes ricinus* ticks from France and co-infection with *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Babesia* sp. Vet Res 36, 79-87.

Hartelt K., Pluta S., Oehme R., Kimmig P., 2008, Spread of ticks and tick-borne diseases in Germany due to global warming. Parasitol Res 103 Suppl 1, S109-116.

Häselbarth K., Tenter A.M., Brade V., Krieger G., Hunfeld K.P., 2007, First case of human babesiosis in Germany - Clinical presentation and molecular characterisation of the pathogen. Int J Med Microbiol 297, 197-204.

Heikkilä H.M., Bondarenko A., Mihalkov A., Pfister K., Spillmann T., 2010, *Anaplasma phagocytophilum* infection in a domestic cat in Finland: Case report. Acta Vet Scand 52, 62.

Hercik K., Hášová V., Janeček J., Branny P., 2007, Molecular evidence of *Bartonella* DNA in Ixodid ticks in Czechia. Folia Microbiol (Praha) 52, 503-509.

Herron M.J., Ericson M.E., Kurtti T.J., Munderloh U.G., 2005, The interactions of *Anaplasma phagocytophilum*, endothelial cells, and human neutrophils. Ann N Y Acad Sci 1063, 374-382.

Herwaldt B.L., Cacciò S., Gherlinzoni F., Aspöck H., Slemenda S.B., Piccaluga P., Martinelli G., Edelhofer R., Hollenstein U., Poletti G., Pampiglione S., Löschenberger K., Tura S., Pieniazek N.J., 2003, Molecular characterization of a non-*Babesia divergens* organism causing zoonotic babesiosis in Europe. Emerg Infect Dis 9, 942-948.

Herwaldt B.L., Montgomery S., Wodhall D., Bossermann E.A., 2012, Babesiosis Surveillance - 18 States, 2011. MMWR; July 13, 2012 / 61(27); 505-509, <http://www.cdc.gov/parasites/babesiosis>.

Heyman P., Cochez C., Hofhuis A., van der Giessen J., Sprong H., Porter S.R., Losson B., Saegerman C., Donoso-Mantke O., Niedrig M., Papa A., 2010, A clear and present danger: tick-borne diseases in Europe. Expert Rev Anti Infect Ther 8, 33-50.

Hildebrandt A., Hunfeld K.P., Baier M., Krumbholz A., Sachse S., Lorenzen T., Kiehntopf M., Fricke H.J., Straube E., 2007, First confirmed autochthonous case of human *Babesia microti* infection in Europe. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 26, 595-601.

Hildebrandt A., Krämer A., Sachse S., Straube E., 2010a, Detection of *Rickettsia* spp. and *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* ticks in a region of Middle Germany (Thuringia). Ticks Tick Borne Dis 1, 52-56.

Hildebrandt A., Pauliks K., Sachse S., Straube E., 2010b, Coexistence of *Borrelia* spp. and *Babesia* spp. in *Ixodes ricinus* ticks in Middle Germany. Vector Borne Zoonotic Dis 10, 831-837.

Hildebrandt A., Franke J., Schmoock G., Pauliks K., Krämer A., Straube E., 2011, Diversity and coexistence of tick-borne pathogens in central Germany. J Med Entomol 48, 651-655.

Hillyard P.D., 1996, Ticks of North-West Europe, Synopses of the British Fauna No.52. The Linnean Society of London, London.

Hoby S., Mathis A., Doherr M.G., Robert N., Ryser-Degiorgis M.P., 2009, *Babesia capreoli* infections in alpine chamois (*Rupicapra r. Rupicapra*), roe deer (*Capreolus c. Capreolus*) and red deer (*Cervus elaphus*) from Switzerland. J Wildl Dis 45, 748-753.

Homer M.J., Aguilar-Delfin I., Telford S.R., 3rd, Krause P.J., Persing D.H., 2000, Babesiosis. Clin Microbiol Rev 13, 451-469.

Hothorn T., Bretz F., Westfall P., 2008, Simultaneous Inference in General Parametric Models. Biometric Journal, 50 (3), 346-363.

Hulinská D., Langrová K., Pejčoch M., Pavlásek I., 2004, Detection of *Anaplasma phagocytophilum* in animals by real-time polymerase chain reaction. APMIS 112, 239-247.

Hunfeld K.P., Hildebrandt A., Gray J.S., 2008, Babesiosis: recent insights into an ancient disease. Int J Parasitol 38, 1219-1237.

Ihler G.M., 1996, *Bartonella bacilliformis*: dangerous pathogen slowly emerging from deep background. FEMS Microbiol Lett 144, 1-11.

Jaenson T.G., Jaenson D.G., Eisen L., Petersson E., Lindgren E., 2012, Changes in the geographical distribution and abundance of the tick *Ixodes ricinus* during the past 30 years in Sweden. Parasit Vectors 5, 8.

Janecek E., Mietze A., Goethe R., Schnieder T., Strube C., 2012, *Bartonella* spp. infection rate and *B. grahamii* in ticks. Emerg Infect Dis 18, 1689-1690.

Jensen J., Simon D., Murua Escobar H., Soller J.T., Bullerdiek J., Beelitz P., Pfister K., Nolte I., 2007, *Anaplasma phagocytophilum* in dogs in Germany. Zoonoses Public Health 54, 94-101.

Jensen P.M., Hansen H., Frandsen F., 2000, Spatial risk assessment for Lyme borreliosis in Denmark. Scand J Infect Dis 32, 545-550.

Jensen P.M., Jespersen J.B., 2005, Five decades of tick-man interaction in Denmark-an analysis. Exp Appl Acarol 35, 131-146.

Jereb M., Pecaver B., Tomazic J., Muzlovic I., Avsic-Zupanc T., Premru-Srsen T., Levicnik-Stežinar S., Karner P., Strle F., 2012, Severe human granulocytic anaplasmosis transmitted by blood transfusion. Emerg Infect Dis 18, 1354-1357.

Karbowiak G., 2004, Zoonotic reservoir of *Babesia microti* in Poland. Pol J Microbiol 53 Suppl, 61-65.

Kiffner C., Lödige C., Alings M., Vor T., Rühle F., 2010, Abundance estimation of *Ixodes* ticks (Acari: Ixodidae) on roe deer (*Capreolus capreolus*). Exp Appl Acarol 52, 73-84.

Kiffner C., Lödige C., Alings M., Vor T., Rühle F., 2011, Body-mass or sex-biased tick parasitism in roe deer (*Capreolus capreolus*)? A GAMLSS approach. Med Vet Entomol 25, 39-45.

- Kohn B., Galke D., Beelitz P., Pfister K., 2008, Clinical features of canine granulocytic anaplasmosis in 18 naturally infected dogs. *J Vet Intern Med* 22, 1289-1295.
- Kohn B., Silaghi C., Galke D., Arndt G., Pfister K., 2011, Infections with *Anaplasma phagocytophilum* in dogs in Germany. *Res Vet Sci* 91, 71-76.
- Leiby D.A., 2011, Transfusion-transmitted *Babesia* spp.: bull's-eye on *Babesia microti*. *Clin Microbiol Rev* 24, 14-28.
- Lempereur L., Lebrun M., Cuvelier P., Sépult G., Caron Y., Saegerman C., Shiels B., Losson B., 2012, Longitudinal field study on bovine *Babesia* spp. and *Anaplasma phagocytophilum* infections during a grazing season in Belgium. *Parasitol Res* 110, 1525-1530.
- Leonhard S., 2005, Untersuchungen zur Häufigkeit von *Borrelia burgdorferi sensu lato*, *Anaplasma phagocytophilum* und *Babesia* spp. in *Ixodes ricinus* aus Bayern und Baden-Württemberg. Dissertation, LMU München; Tierärztliche Fakultät.
- Li S., Heyman P., Cochez C., Simons L., Vanwambeke S.O., 2012, A multi-level analysis of the relationship between environmental factors and questing *Ixodes ricinus* dynamics in Belgium. *Parasit Vectors* 5, 149.
- Liz J.S., Anderes L., Sumner J.W., Massung R.F., Gern L., Rutti B., Brossard M., 2000, PCR detection of granulocytic ehrlichiae in *Ixodes ricinus* ticks and wild small mammals in western Switzerland. *J Clin Microbiol* 38, 1002-1007.
- Liz J.S., Sumner J.W., Pfister K., Brossard M., 2002, PCR detection and serological evidence of granulocytic ehrlichial infection in roe deer (*Capreolus capreolus*) and chamois (*Rupicapra rupicapra*). *J Clin Microbiol* 40, 892-897.
- Lommano E., Bertaiola L., Dupasquier C., Gern L., 2012, Infections and coinfections of questing *Ixodes ricinus* ticks by emerging zoonotic pathogens in Western Switzerland. *Appl Environ Microbiol* 78, 4606-4612.

Madeddu G., Mancini F., Caddeo A., Ciervo A., Babudieri S., Maida I., Fiori M.L., Rezza G., Mura M.S., 2012, *Rickettsia monacensis* as cause of Mediterranean spotted fever-like illness, Italy. Emerg Infect Dis 18, 702-704.

Maggi R.G., Diniz P.P., Cadenas M.B., Breitschwerdt E.B., 2006, The use of Molecular diagnostic Techniques to detect *Anaplasma*, *Bartonella* and *Ehrlichia* Species in Arthropods or Patients. In: The International Canine Vector-Borne Disease Symposium; April 18th-20th, 2006; Billesley, Alcester, UK, 2006, 9-14.

Malandrin L., Jouglin M., Sun Y., Brisseau N., Chauvin A., 2010, Redescription of *Babesia capreoli* (Enigk and Friedhoff, 1962) from roe deer (*Capreolus capreolus*): isolation, cultivation, host specificity, molecular characterisation and differentiation from *Babesia divergens*. Int J Parasitol 40, 277-284.

Martinot M., Zadeh M.M., Hansmann Y., Grawey I., Christmann D., Aguillon S., Jouglin M., Chauvin A., De Briel D., 2011, Babesiosis in immunocompetent patients, Europe. Emerg Infect Dis 17, 114-116.

Massung R.F., Slater K., Owens J.H., Nicholson W.L., Mather T.N., Solberg V.B., Olson J.G., 1998, Nested PCR assay for detection of granulocytic ehrlichiae. J Clin Microbiol 36, 1090-1095.

Masuzawa T., Uchishima Y., Fukui T., Okamoto Y., Muto M., Koizumi N., Yamada A., 2011, Detection of *Anaplasma phagocytophilum* from Wild Boars and Deer in Japan. Jpn J Infect Dis 64, 333-336.

Medlock J.M., Hansford K.M., Bormane A., Derdakova M., Estrada-Peña A., George J.C., Golovljova I., Jaenson T.G., Jensen J.K., Jensen P.M., Kazimirova M., Oteo J.A., Papa A., Pfister K., Plantard O., Randolph S.E., Rizzoli A., Santos-Silva M.M., Sprong H., Vial L., Hendrickx G., Zeller H., Van Bortel W., 2013, Driving forces for changes in geographical distribution of *Ixodes ricinus* ticks in Europe. Parasit Vectors 6, 1.

Meer-Scherrer L., Adelson M., Mordechai E., Lottaz B., Tilton R., 2004, *Babesia microti* infection in Europe. Curr Microbiol 48, 435-437.

- Michalik J., Stańczak J., Cieniuch S., Racewicz M., Sikora B., Dabert M., 2012, Wild Boars as Hosts of Human-Pathogenic *Anaplasma phagocytophilum* Variants. *Emerg Infect Dis* 18, 998-1001.
- Mosbacher M., Elliott S.P., Shehab Z., Pinnas J.L., Klotz J.H., Klotz S.A., 2010, Cat scratch disease and arthropod vectors: more to it than a scratch? *J Am Board Fam Med* 23, 685-686.
- Mosepele M., Mazo D., Cohn J., 2012, *Bartonella* infection in immunocompromised hosts: immunology of vascular infection and vasoproliferation. *Clin Dev Immunol* 2012, 612809.
- Nieder M., Silaghi C., Hamel D., Pfister K., Schmäschke R., Pfeffer M., 2012, Tick-borne fever caused by *Anaplasma phagocytophilum* in Germany. First laboratory confirmed case in a dairy cattle herd. *Tierarztl Prax Ausg G Grosstiere Nutztiere* 40, 101-106.
- Nilsson K., Lindquist O., Pålson C., 1999, Association of *Rickettsia helvetica* with chronic perimyocarditis in sudden cardiac death. *Lancet* 354, 1169-1173.
- Nilsson K., Elfving K., Pålson C., 2010, *Rickettsia helvetica* in patient with meningitis, Sweden, 2006. *Emerg Infect Dis* 16, 490-492.
- Ogden N.H., Bown K., Horrocks B.K., Woldehiwet Z., Bennett M., 1998, Granulocytic *Ehrlichia* infection in *Ixodid ticks* and mammals in woodlands and uplands of the U.K. *Med Vet Entomol* 12, 423-429.
- Øines O., Radzijeuskaja J., Paulauskas A., Rosef O., 2012, Prevalence and diversity of *Babesia* spp. in questing *Ixodes ricinus* ticks from Norway. *Parasit Vectors* 5, 156.
- Oporto B., Gil H., Barral M., Hurtado A., Juste R.A., Garcia-Perez A.L., 2003, A survey on *Anaplasma phagocytophila* in wild small mammals and roe deer (*Capreolus capreolus*) in Northern Spain. *Ann N Y Acad Sci* 990, 98-102.
- Oz H.S., Westlund K.H., 2012, "Human babesiosis": an emerging transfusion dilemma. *Int J Hepatol* 2012, 431761.

Parola P., Raoult D., 2001, Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. Clin Infect Dis 32, 897-928.

Parola P., Davoust B., Raoult D., 2005, Tick- and flea-borne rickettsial emerging zoonoses. Vet Res 36, 469-492.

Petrovec M., Lotric Furlan S., Zupanc T.A., Strle F., Brouqui P., Roux V., Dumler J.S., 1997, Human disease in Europe caused by a granulocytic *Ehrlichia* species. J Clin Microbiol 35, 1556-1559.

Petrovec M., Bidovec A., Sumner J.W., Nicholson W.L., Childs J.E., Avsic-Zupanc T., 2002, Infection with *Anaplasma phagocytophila* in cervids from Slovenia: evidence of two genotypic lineages. Wien Klin Wochenschr 114, 641-647.

Petrovec M., Sixl W., Schweiger R., Mikulasek S., Elke L., Wüst G., Marth E., Strasek K., Stünzner D., Avsic-Zupanc T., 2003, Infections of wild animals with *Anaplasma phagocytophila* in Austria and the Czech Republic. Ann N Y Acad Sci 990, 103-106.

Pfäffle M., Petney T., Elgas M., Skuballa J., Taraschewski H., 2009, Tick-induced blood loss leads to regenerative anaemia in the European hedgehog (*Erinaceus europaeus*). Parasitology 136, 443-452.

Pichon B., Kahl O., Hammer B., Gray J.S., 2006, Pathogens and host DNA in *Ixodes ricinus* nymphal ticks from a German forest. Vector Borne Zoonotic Dis 6, 382-387.

Pluta S., Tewald F., Hartelt K., Oehme R., Kimmig P., Mackenstedt U., 2009, *Rickettsia slovaca* in *Dermacentor marginatus* ticks, Germany. Emerg Infect Dis 15, 2077-2078.

Polin H., Hufnagl P., Haunschmid R., Gruber F., Ladurner G., 2004, Molecular evidence of *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* ticks and wild animals in Austria. J Clin Microbiol 42, 2285-2286.

Poljak S., 2012, Epidemiologische Studie zu zeckenübertragenen Krankheitserregern in *Ixodes ricinus* aus bayerischen Parkanlagen. Dissertation, LMU München; Tierärztliche Fakultät.

Portillo A., Pérez-Martínez L., Santibáñez S., Santibáñez P., Palomar A.M., Oteo J.A., 2011, *Anaplasma* spp. in wild mammals and *Ixodes ricinus* from the north of Spain. Vector Borne Zoonotic Dis 11, 3-8.

R Development Core Team, 2012, R: A language and environment for statistical computing. Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.

Radulović Z., Chochlakis D., Tomanović S., Milutinović M., Tselentis Y., Psaroulaki A., 2011, First detection of spotted fever group Rickettsiae in ticks in Serbia. Vector Borne Zoonotic Dis 11, 111-115.

Randolph S.E., 2004, Tick ecology: processes and patterns behind the epidemiological risk posed by ixodid ticks as vectors. Parasitology 129 Suppl, S37-65.

Rar V.A., Epikhina T.I., Livanova N.N., Panov V.V., Doroschenko E.K., Pukhovskaya N.M., Vysochina N.P., Ivanov L.I., 2011, Genetic variability of *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes persulcatus* ticks and small mammals in the Asian part of Russia. Vector Borne Zoonotic Dis 11, 1013-1021.

Regnery R.L., Spruill C.L., Plikaytis B.D., 1991, Genotypic identification of *rickettsiae* and estimation of intraspecies sequence divergence for portions of two rickettsial genes. J Bacteriol 173, 1576-1589.

Reis C., Cote M., Paul R.E., Bonnet S., 2011, Questing ticks in suburban forest are infected by at least six tick-borne pathogens. Vector Borne Zoonotic Dis 11, 907-916.

Reye A.L., Hübschen J.M., Sausy A., Müller C.P., 2010, Prevalence and seasonality of tick-borne pathogens in questing *Ixodes ricinus* ticks from Luxembourg. Appl Environ Microbiol 76, 2923-2931.

Reye A.L., Stegny V., Mishaeva N.P., Velhin S., Hübschen J.M., Ignatyev G., Muller C.P., 2013, Prevalence of Tick-Borne Pathogens in *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus* Ticks from Different Geographical Locations in Belarus. PLoS One 8, e54476.

Richter J., Fournier P.E., Petridou J., Häussinger D., Raoult D., 2002, *Rickettsia felis* infection acquired in Europe and documented by polymerase chain reaction. Emerg Infect Dis 8, 207-208.

Rikihisa Y., 1991, The tribe *Ehrlichieae* and ehrlichial diseases. Clin Microbiol Rev 4, 286-308.

Rikihisa Y., 2011, Mechanisms of obligatory intracellular infection with *Anaplasma phagocytophilum*. Clin Microbiol Rev 24, 469-489.

Rolle M., Mayr A., 2006, Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. 8. Aufl. Edition. MVS Medizinverlage Stuttgart.

Roux V., Raoult D., 2000, Phylogenetic analysis of members of the genus *Rickettsia* using the gene encoding the outer-membrane protein rOmpB (*ompB*). Int J Syst Evol Microbiol 50 Pt 4, 1449-1455.

Rymaszewska A., 2008, Divergence within the marker region of the *groESL* operon in *Anaplasma phagocytophilum*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 27, 1025-1036.

Santos-Silva M.M., Sousa R., Santos A.S., Melo P., Encarnação V., Bacellar F., 2006, Ticks parasitizing wild birds in Portugal: detection of *Rickettsia aeschlimannii*, *R. helvetica* and *R. massiliae*. Exp Appl Acarol 39, 331-338.

Schaarschmidt-Kiener D., Graf F., von Loewenich F.D., Muller W., 2009, *Anaplasma phagocytophilum* infection in a cat in Switzerland. Schweiz Arch Tierheilkd 151, 336-341.

Scharf W., Schauer S., Freyburger F., Petrovec M., Schaarschmidt-Kiener D., Liebisch G., Runge M., Ganter M., Kehl A., Dumler J.S., Garcia-Perez A.L., Jensen J., Fingerle V., Meli M.L., Ensser A., Stuenkel S., von Loewenich F.D., 2011, Distinct host species correlate with *Anaplasma phagocytophilum ankA* gene clusters. J Clin Microbiol 49, 790-796.

- Scharlemann J.P., Johnson P.J., Smith A.A., Macdonald D.W., Randolph S.E., 2008, Trends in ixodid tick abundance and distribution in Great Britain. *Med Vet Entomol* 22, 238-247.
- Schex S., Dobler G., Riehm J., Müller J., Essbauer S., 2011, *Rickettsia* spp. in wild small mammals in Lower Bavaria, South-Eastern Germany. *Vector Borne Zoonotic Dis* 11, 493-502.
- Schicht S., Junge S., Schnieder T., Strube C., 2011, Prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* and coinfection with *Borrelia burgdorferi* sensu lato in the hard tick *Ixodes ricinus* in the city of Hanover (Germany). *Vector Borne Zoonotic Dis* 11, 1595-1597.
- Schicht S., Schnieder T., Strube C., 2012, *Rickettsia* spp. and coinfections with other pathogenic microorganisms in hard ticks from northern Germany. *J Med Entomol* 49, 766-771.
- Schnittger L., Rodriguez A.E., Florin-Christensen M., Morrison D.A., 2012, *Babesia*: A world emerging. *Infect Genet Evol* 12, 1788-1809.
- Schorn S., Pfister K., Reulen H., Mahling M., Manitz J., Thiel C., Silaghi C., 2011a, Prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* in Bavarian public parks, Germany. *Ticks Tick Borne Dis* 2, 196-203.
- Schorn S., Pfister K., Reulen H., Mahling M., Silaghi C., 2011b, Occurrence of *Babesia* spp., *Rickettsia* spp. and *Bartonella* spp. in *Ixodes ricinus* in Bavarian public parks, Germany. *Parasit Vectors* 4, 135.
- Schouls L.M., Van De Pol I., Rijpkema S.G., Schot C.S., 1999, Detection and identification of *Ehrlichia*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, and *Bartonella* species in Dutch *Ixodes ricinus* ticks. *J Clin Microbiol* 37, 2215-2222.
- Schüle R., Seubert A., Gille C., Lanz C., Hansmann Y., Piémont Y., Dehio C., 2001, Invasion and persistent intracellular colonization of erythrocytes. A unique parasitic strategy of the emerging pathogen *Bartonella*. *J Exp Med* 193, 1077-1086.

Schwarz A., Maier W.A., Kistemann T., Kampen H., 2009, Analysis of the distribution of the tick *Ixodes ricinus* L. (Acari: Ixodidae) in a nature reserve of western Germany using Geographic Information Systems. Int J Hyg Environ Health 212, 87-96.

Seitz R., Lang A., Hanak A., Urban R., 2012, Der Schlosspark Nymphenburg als Teil eines Natura 2000-Gebietes. LWF Wissen 68-Schlosspark Nymphenburg-Waldpflege als Denkmalpflege und Biotopenschutz, Berichte der Bayerischen Landesanstalt für Wald und Forstwirtschaft, S.46-54.

Silaghi C., 2008, Prevalence and genetic analysis of *Anaplasma phagocytophilum* and Spotted Fever Group rickettsiae in the tick *Ixodes ricinus* in urban and periurban sites in southern Germany. Dissertation, LMU München: Tierärztliche Fakultät.

Silaghi C., Gilles J., Höhle M., Fingerle V., Just F.T., Pfister K., 2008a, *Anaplasma phagocytophilum* infection in *Ixodes ricinus*, Bavaria, Germany. Emerg Infect Dis 14, 972-974.

Silaghi C., Gilles J., Höhle M., Pradel I., Just F.T., Fingerle V., Küchenhoff H., Pfister K., 2008b, Prevalence of spotted fever group rickettsiae in *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) in southern Germany. J Med Entomol 45, 948-955.

Silaghi C., Hamel D., Pfister K., Rehbein S., 2011a, *Babesia* species and co-infection with *Anaplasma phagocytophilum* in free-ranging ungulates from Tyrol (Austria). Wien. Tierärztliche Mschr.-Vet. Med. Austria 98 (2011), 268-274.

Silaghi C., Hamel D., Thiel C., Pfister K., Passos L.M., Rehbein S., 2011b, Genetic variants of *Anaplasma phagocytophilum* in wild caprine and cervid ungulates from the Alps in Tyrol, Austria. Vector Borne Zoonotic Dis 11, 355-362.

Silaghi C., Hamel D., Thiel C., Pfister K., Pfeffer M., 2011c, Spotted fever group rickettsiae in ticks, Germany. Emerg Infect Dis 17, 890-892.

Silaghi C., Kauffmann M., Passos L.M., Pfister K., Zweggarth E., 2011d, Isolation, propagation and preliminary characterisation of *Anaplasma phagocytophilum* from roe deer (*Capreolus capreolus*) in the tick cell line IDE8. Ticks Tick Borne Dis 2, 204-208.

Silaghi C., Kohn B., Chirek A., Thiel C., Nolte I., Liebisch G., Pfister K., 2011e, Relationship of molecular and clinical findings on *Anaplasma phagocytophilum* involved in natural infections of dogs. J Clin Microbiol 49, 4413-4414.

Silaghi C., Liebisch G., Pfister K., 2011f, Genetic variants of *Anaplasma phagocytophilum* from 14 equine granulocytic anaplasmosis cases. Parasit Vectors 4, 161.

Silaghi C., Scheuerle M.C., Friche Passos L.M., Thiel C., Pfister K., 2011g, PCR detection of *Anaplasma phagocytophilum* in goat flocks in an area endemic for tick-borne fever in Switzerland. Parasite 18, 57-62.

Silaghi C., Skuballa J., Thiel C., Pfister K., Petney T., Pfäffle M., Taraschewski H., Passos L.M., 2012a, The European hedgehog (*Erinaceus europaeus*)-a suitable reservoir for variants of *Anaplasma phagocytophilum*? Ticks Tick Borne Dis 3, 49-54.

Silaghi C., Woll D., Hamel D., Pfister K., Mahling M., Pfeffer M., 2012b, *Babesia* spp. and *Anaplasma phagocytophilum* in questing ticks, ticks parasitizing rodents and the parasitized rodents - Analyzing the host-pathogen-vector interface in a metropolitan area. Parasit Vectors 5, 191.

Simser J.A., Palmer A.T., Fingerle V., Wilske B., Kurti T.J., Munderloh U.G., 2002, *Rickettsia monacensis* sp. nov., a spotted fever group Rickettsia, from ticks (*Ixodes ricinus*) collected in a European city park. Appl Environ Microbiol 68, 4559-4566.

Siński E., Bajer A., Welc R., Pawełczyk A., Ogrzewalska M., Behnke J.M., 2006, *Babesia microti*: prevalence in wild rodents and *Ixodes ricinus* ticks from the Mazury Lakes District of North-Eastern Poland. Int J Med Microbiol 296 Suppl 40, 137-143.

Skarphedinsson S., Lyholm B.F., Ljungberg M., Sogaard P., Kolmos H.J., Nielsen L.P., 2007, Detection and identification of *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi*, and *Rickettsia helvetica* in Danish *Ixodes ricinus* ticks. APMIS 115, 225-230.

Skarphéðinsson S., Jensen P.M., Kristiansen K., 2005, Survey of tickborne infections in Denmark. Emerg Infect Dis 11, 1055-1061.

- Skotarczak B., Adamska M., 2005, Detection of *Bartonella* DNA in roe deer (*Capreolus capreolus*) and in ticks removed from deer. Eur J of Wildl Res 51, 287-290.
- Skotarczak B., Rymaszewska A., Wodecka B., Sawczuk M., Adamska M., Maciejewska A., 2006, PCR detection of granulocytic *Anaplasma* and *Babesia* in *Ixodes ricinus* ticks and birds in west-central Poland. Ann Agric Environ Med 13, 21-23.
- Skotarczak B., Adamska M., Sawczuk M., Maciejewska A., Wodecka B., Rymaszewska A., 2008, Coexistence of tick-borne pathogens in game animals and ticks in western Poland. Vet Med 53, 668-675.
- Smetanová K., Schwarzová K., Kocianová E., 2006, Detection of *Anaplasma phagocytophilum*, *Coxiella burnetii*, *Rickettsia* spp., and *Borrelia burgdorferi* s. l. in Ticks, and wild-living animals in western and middle Slovakia. Ann N Y Acad Sci 1078, 312-315.
- Socolovschi C., Mediannikov O., Raoult D., Parola P., 2009, The relationship between spotted fever group *Rickettsiae* and Ixodid ticks. Vet Res 40, 34.
- Soleng A., Kjelland V., 2012, *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* ticks in Brønnøysund in northern Norway. Ticks Tick Borne Dis. In press.
- Sonenshine D.E., 1991, Biology of Ticks, Volume 1. Oxford University Press, New York.
- Sonenshine D.E., 1993, Biology of Ticks, Volume 2. Oxford University Press, New York.
- Stadt Regensburg Umweltreferat-Gartenamt, 1996, Der Dörnbergpark in Regensburg Parkpflegewerk Geschichte, Bestand, Zukunft, ISBN-Nr.: 3-925753-53-2.
- Stańczak J., Racewicz M., Michalik J., Cieniuch S., Sikora B., Skoracki M., 2009, Prevalence of infection with *Rickettsia helvetica* in feeding ticks and their hosts in western Poland. Clin Microbiol Infect 15 Suppl 2, 328-329.

Stefanidesova K., Kocianova E., Boldis V., Kostanova Z., Kanka P., Nemethova D., Spitalska E., 2008, Evidence of *Anaplasma phagocytophilum* and *Rickettsia helvetica* infection in free-ranging ungulates in central Slovakia. Eur J Wildl Res 54, 519-524.

Stuen S., Van De Pol I., Bergström K., Schouls L.M., 2002, Identification of *Anaplasma phagocytophila* (formerly *Ehrlichia phagocytophila*) variants in blood from sheep in Norway. J Clin Microbiol 40, 3192-3197.

Subramanian G., Sekeyova Z., Raoult D., Mediannikov O., 2012, Multiple tick-associated bacteria in *Ixodes ricinus* from Slovakia. Ticks Tick Borne Dis. In press 3, 406-410.

Süss J., Fingerle V., Hunfeld K.P., Schrader C., Wilske B., 2004, [Tick-borne human pathogenic microorganisms found in Europe and those considered nonpathogenic. Part II: Bacteria, parasites and mixed infections]. Bundesgesundheitsbl - Gesundheitsforsch - Gesundheitsschutz 47, 470-486.

Sytykiewicz H., Karbowiak G., Hapunik J., Szpechciński A., Supergan-Marwicz M., Goławska S., Sprawka I., Czerniewicz P., 2012, Molecular evidence of *Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia microti* co-infections in *Ixodes ricinus* ticks in central-eastern region of Poland. Ann Agric Environ Med 19, 45-49.

Tadin A., Turk N., Korva M., Margaletić J., Beck R., Vucelja M., Habuš J., Svoboda P., Županc T.A., Henttonen H., Markotić A., 2012, Multiple co-infections of rodents with hantaviruses, *Leptospira*, and *Babesia* in Croatia. Vector Borne Zoonotic Dis 12, 388-392.

Tälleklint L., Jaenson T.G., 1997, Infestation of mammals by *Ixodes ricinus* ticks (Acari: Ixodidae) in south-central Sweden. Exp Appl Acarol 21, 755-771.

Tampieri M.P., Galuppi R., Bonoli C., Cancrini G., Moretti A., Pietrobelli M., 2008, Wild ungulates as *Babesia* hosts in northern and central Italy. Vector Borne Zoonotic Dis 8, 667-674.

Tatchell R.J., Moorhouse D.E., 1970, Neutrophils: their role in the formation of a tick feeding lesion. Science 167, 1002-1003.

Telford S.R., 3rd, Wormser G.P., 2010, *Bartonella* spp. transmission by ticks not established. Emerg Infect Dis 16, 379-384.

Vayssier-Taussat M., Le Rhun D., Bonnet S., Cotté V., 2009, Insights in *Bartonella* host specificity. Ann N Y Acad Sci 1166, 127-132.

Vázquez L., Panadero R., Dacal V., Pato F.J., López C., Diaz P., Arias M.S., Fernández G., Díez-Baños P., Morrondo P., 2011, Tick infestation (Acari: Ixodidae) in roe deer (*Capreolus capreolus*) from northwestern Spain: population dynamics and risk stratification. Exp Appl Acarol 53, 399-409.

Von Loewenich F.D., Stumpf G., Baumgarten B.U., Röllinghoff M., Dumler J.S., Bogdan C., 2003, A case of equine granulocytic ehrlichiosis provides molecular evidence for the presence of pathogenic *Anaplasma phagocytophilum* (HGE agent) in Germany. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 22, 303-305.

Vor T., Kiffner C., Hagedorn P., Niedrig M., Rühle F., 2010, Tick burden on European roe deer (*Capreolus capreolus*). Exp Appl Acarol 51, 405-417.

Welc-Falęciak R., Bajer A., Paziewska-Harris A., Baumann-Popczyk A., Siński E., 2012, Diversity of *Babesia* in *Ixodes ricinus* ticks in Poland. Adv Med Sci, 1-6.

Woldehiwet Z., Scott G.R., 1982a, Differentiation of strains of *Cytoecetes phagocytophila*, the causative agent of tick-borne fever, by complement fixation. J Comp Pathol 92, 475-478.

Woldehiwet Z., Scott G.R., 1982b, Stages in the development of *Cytoecetes phagocytophila*, the causative agent of tick-borne fever. J Comp Pathol 92, 469-474.

Woldehiwet Z., 1987, The effects of tick-borne fever on some functions of polymorphonuclear cells of sheep. J Comp Pathol 97, 481-485.

Woldehiwet Z., 2008, Immune evasion and immunosuppression by *Anaplasma phagocytophilum*, the causative agent of tick-borne fever of ruminants and human granulocytic anaplasmosis. Vet J 175, 37-44.

Woldehiwet Z., 2010, The natural history of *Anaplasma phagocytophilum*. Vet Parasitol 167, 108-122.

Zamoto A., Tsuji M., Kawabuchi T., Wei Q., Asakawa M., Ishihara C., 2004, U.S.-type *Babesia microti* isolated from small wild mammals in Eastern Hokkaido, Japan. J Vet Med Sci 66, 919-926.

Žele D., Avberšek J., Gruntar I., Ocepek M., Vengušt G., 2012, Evidence of *Anaplasma phagocytophilum* in game animals from Slovenia. Acta Vet Hung 60, 441-448.

Zeman P., Pecha M., 2008, Segregation of genetic variants of *Anaplasma phagocytophilum* circulating among wild ruminants within a Bohemian forest (Czech Republic). Int J Med Microbiol 298, 203-210.

Zintl A., Mulcahy G., Skerrett H.E., Taylor S.M., Gray J.S., 2003, *Babesia divergens*, a bovine blood parasite of veterinary and zoonotic importance. Clin Microbiol Rev 16, 622-636.

X. ABBILDUNGEN

Abb. 1: Taxonomische Einordnung von *I. ricinus* [modifiziert nach (Eckert et al., 2008; Poljak, 2012)]

Abb. 2: Lebenszyklus von *I. ricinus* [modifiziert nach (Eckert et al., 2008; Poljak, 2012)]

Abb. 3: Englischer Garten

Abb. 4: Nymphenburger Schlosspark

Abb. 5: Dörnbergpark

Abb. 6: Schlosspark Berg

Abb. 7: Kerschlach

Abb. 8: Angelberger Forst

Abb. 9: Jahresvergleich 2011/2012 der Anzahl auf Streckenabschnitt I-III gesammelter *I. ricinus* je Geschlecht und Entwicklungsstadium

Abb. 10: Jahresvergleich der Zeckendichte in 2011 und 2012 (adulte Zecken und Nymphen) in den Sammelmonaten April, Mai und Juni je Standort pro 100m²

XI. TABELLEN

Tab. 1: *Babesia* spp.-Prävalenz in wirtssuchenden *I. ricinus* in verschiedenen Habitaten und europäischen Ländern

Tab. 2: *Anaplasma phagocytophilum*-Prävalenz in wirtssuchenden *I. ricinus* in verschiedenen Habitaten und europäischen Ländern

Tab. 3: *Rickettsia* spp.-Prävalenz in wirtssuchenden *I. ricinus* in verschiedenen Habitaten und europäischen Ländern

Tab. 4: angewandte DNA-Extrakt-Verdünnungsschemata [Zecken wirtssuchend, Proben von Rehwild (Zecken gesaugt und Blut-, Milz- und Hautproben)]

Tab. 5: Übersicht der auf *Babesia* spp., *A. phagocytophilum*, *Rickettsia* spp. und *Bartonella* spp. untersuchten Proben

Tab. 6: PCR-Bedingungen und verwendete Primer für den Nachweis von *Babesia* spp., *Anaplasma phagocytophilum*, *Rickettsia* spp. und *Bartonella* spp.

Tab. 7: Alter, Geschlecht und Allgemeinzustand der zwischen September 2010 und Januar 2012 untersuchten Rehwildindividuen im Angelberger Forst, Bayern, Deutschland

Tab. 8: Anzahl gefundener Zecken auf Streckenabschnitt I-III (300m²) je Standort, Monat und Jahr

Tab. 9: Anzahl aller gesammelter *Ixodes ricinus* pro Standort und Monat in den Jahren 2011 und 2012

Tab. 10: Prävalenz von *Babesia* spp. und *Rickettsia* spp. in *Ixodes ricinus*-Zecken pro Monat in 2011 und 2012

Tab. 11: Gesamtmodell der logistischen Regression mit allen Berechnungen für wirtssuchende Zecken (Entwicklungsstadien, Monat, Jahr, Habitat, Standort)

Tab. 12: Simultaner paarweiser Test auf Unterschiede der Mittelwerte mit Tukey Kontrasten für wirtssuchende Zecken (Entwicklungsstadien, Monate, Habitate, Standorte)

Tab. 13: Berechnung signifikanter Unterschiede (Exakter Test nach Fisher und Binomialtest) für wirtssuchende Zecken und Rehproben am Wald-Standort (gesaugte Zecken, Blut-, Milz- und Hautproben, Geschlecht, Alter, Erreger)

XII. ANHANG

1. Material

1.1. Geräte

Tissue Lyser	(Qiagen, Hilden, Deutschland)
Thermomixer® comfort	(Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
Maxwell® 16 System	(Promega, Mannheim, Deutschland)
Nano Drop ND-1000	(PeqLab Erlangen, Deutschland)
AB-7500-Real-Time PCR Gerät	(Applied Biosystems®, Darmstadt, Deutschland)
AB-7500 FAST Real-Time PCR System	(Applied Biosystems®, Darmstadt, Deutschland)
Thermocycler Mastercycler® gradient	(Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
Gelkammern verschiedener Größen	(PeqLab Erlangen, Deutschland)
Geldokumentationssystem (UV-Licht)	(PeqLab Erlangen, Deutschland)

1.2. Kits

Maxwell® 16 LEV Blood DNA Kit	(Promega, Mannheim, Deutschland)
QIAquick PCR Purification Kit	(Qiagen, Hilden, Deutschland)
SYBR® Green PCR Master Mix 2x	(Applied Biosystems®, Darmstadt, Deutschland)
Taq Man®	
fast Universal PCR Mastermix 2x	(Applied Biosystems®, Darmstadt, Deutschland)
HotStarTaqPlus DNA Polymerase Kit	(Qiagen, Hilden, Deutschland)
Expand High Fidelity ^{PLUS} PCR System	(Roche, Mannheim, Deutschland)

1.3. Nukleotide, Primer

dNTP mix, PCR Grade	(Qiagen, Hilden, Deutschland)
PCR Nucleotide Mix	(Roche, Mannheim, Deutschland)
BJ1, BN2	(Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Germany)
ApMsp2f, ApMsp2r	(Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Germany)
ApMsp2p	
(Sonde markiert mit FAM-TAMRA)	(Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Germany)
ge3a, ge10r	(Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Germany)
ge9f, ge2	(Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Germany)
RpCs877p, RpCs1258n	(Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Germany)
120-2788, 120-3599	(Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Germany)
BA325s, Ba1100as	(Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Germany)

1.4. Chemikalien

PBS	(Sigma-Aldrich® Chemie, München, Deutschland)
Molekularbiologisch reines H ₂ O	(Sigma-Aldrich® Chemie, München, Deutschland)
Ethanol, reinst	(Roth®, Karlsruhe, Deutschland)
Ethanol vergällt	(Roth®, Karlsruhe, Deutschland)
Sodium Acetat Puffer	(Sigma-Aldrich® Chemie, München, Deutschland)
Top Vision Agarose	(Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland)
TAE Puffer 50x	(Qiagen, Hilden, Germany)
TBE Puffer 10x	(Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland)
Gel Red™ Nucleid Acid stain, 10.000x in Wasser	(Biotium Hayward, USA)
Gene Ruler 100bp Plus DNA Ladder	(Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland)
6x DNA Loading Dye	(Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland)

2. Sequenzen

2.1. Sequenzvergleich des 18S rRNA Gens von *B. divergens/capreoli*

In dieser Studie verwendete Vergleichssequenzen *B. divergens* (GenBank Nummer FJ944826) und *B. capreoli* (GenBank Nummer FJ944828) mit Basenpaarunterschieden an Position 631 und 663 (Malandrin et al., 2010) und Sequenz aus wirtssuchender Zecke mit 99% Gleichheit zu beiden Vergleichssequenzen

FJ944828Bcap	GGA 480	
FJ944826Bdiv	GGA 480	
5KII70_Zecke	GGA 3	

FJ944828Bcap	ATGATGGTGACCTAAACCCCTCACCAGAGTAACAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAG	540
FJ944826Bdiv	ATGATGGTGACCTAAACCCCTCACCAGAGTAACAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAG	540
5KII70_Zecke	ATGATGGTGACCTAAACCCCTCACCAGAGTAACAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAG	63

FJ944828Bcap	CCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAACTTGTTCAGATTAAAAAGCTCGTAG	600
FJ944826Bdiv	CCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAACTTGTTCAGATTAAAAAGCTCGTAG	600
5KII70_Zecke	CCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAACTTGTTCAGATTAAAAAGCTCGTAG	123

FJ944828Bcap	TTGAATTTTTCGCTGGTGTTAATATTGACTGATGTCGAGATTGCACTTCGCTTTTGGGAT	660
FJ944826Bdiv	TTGAATTTTTCGCTGGTGTTAATATTGACTAATGTCGAGATTGCACTTCGCTTTTGGGAT	660
5KII70_	TTGAATTTTTCGCTGGTGTTAATATTGACTGATGTCGAGATTGCACTTCGCTTTTGGGAT	183

FJ944828Bcap	TTTCCCTTTTACTTTTGAGAAAATTAGAGTGTTTCAAGCAGACTTTTGTCTTGAATACT	720
FJ944826Bdiv	TTATCCCTTTTACTTTTGAGAAAATTAGAGTGTTTCAAGCAGACTTTTGTCTTGAATACT	720
5KII70_Zecke	TTATCCCTTTTACTTTTGAGAAAATTAGAGTGTTTCAAGCAGACTTTTGTCTTGAATACT	243
	** *****	

```

FJ944828Bcap      TCAGCATGGAATAATAGAGTAGGACTTTGGTTCTATTTTGTGGTTTGTGAACCTTAGTA 780
FJ944826Bdiv      TCAGCATGGAATAATAGAGTAGGACTTTGGTTCTATTTTGTGGTTTGTGAACCTTAGTA 780
5KII70_Zecke      TCAGCATGGAATAATAGAGTAGGACTTTGGTTCTATTTTGTGGTTTGTGAACCTTAGTA 303
*****

FJ944828Bcap      ATGGTTAATAGGAACGGTTGGGGGCATTCGTATTTAACTGTCAGAGGTGAAATTCTTAGA 840
FJ944826Bdiv      ATGGTTAATAGGAACGGTTGGGGGCATTCGTATTTAACTGTCAGAGGTGAAATTCTTAGA 840
5KII70_Zecke      ATGGTTAATAGGAACGGTTGGGGGCATTCGTATTTAACTGTCAGAGGTGAAATTCTTAGA 363
*****

FJ944828Bcap      TTTGTTAAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTTGCCAAGGACGTTTTCATTAATCAAGAAC 900
FJ944826Bdiv      TTTGTTAAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTTGCCAAGGACGTTTTCATTAATCAAGAAC 900
5KII70_Zecke      TTTGTTAAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTTGCCAAGGACGTTTTCATTAATCAAGAAC 423
*****

FJ944828Bcap      GAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCCTA 944
FJ944826Bdiv      GAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCCTA 944
5KII70_Zecke      GAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCCTA 467
*****

```

2.2. Sequenzvergleich des 18S rRNA Gens von *Babesia* sp. EU1, *B. capreoli* und *B. microti*

Sequenzvergleich am Beispiel dreier in dieser Studie in wirtssuchenden Zecken gefundener Varianten inkl. GenBank Nummern:

Babesia sp. EU1: KC007116

B. capreoli: KC007121

B. microti: KC007120

```

B.sp.EU1          GGAATGATGGTGAACCTAAACCTCACCAGAGTAACAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAG 60
B.capreoli        GGAATGATGGTGAACCTAAACCTCACCAGAGTAACAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAG 60
B.microti         GGAATGATGGGGAATCTAAACCTTCACCAGAGTATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAG 60
*****

B.sp.EU1          CAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAACCTTGTGTCAGTTAAAGAGCTCG 120
B.capreoli        CAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAACCTTGTGTCAGTTAAAGAGCTCG 120
B.microti         CAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAAGTTGTGTCAGTTAAAGAGCTCG 120
*****

B.sp.EU1          TAGTTGAATTTCTGCGT--T-ATCGAG-----TTATTGACT-CTTG 157
B.capreoli        TAGTTGAATTTTTCGCTGGT-GTTAA-----TATTGACT-GATG 157
B.microti         TAGTTGAATTTCTGCTTGTCAATTAATCTCGCTCCGAGCGTTTATTGCTGGCA 180
*****

B.sp.EU1          TCCTTTAATCGATTT--CGCTTTTGGG----ATTTATCCCTTTTACTTTGAGAAAATTAG 211
B.capreoli        TCGAGATTGCACCTT--CGCTTTTGGG----ATTTTCCCTTTTACTTTGAGAAAATTAG 211
B.microti         TCCTT--CTGGATTTGGTGCCTTCGGGTACTATTTTCAGGATTACTTTGAGAAAATTAG 238
**          * * * * *

B.sp.EU1          AGTGTTCACAGCAGACTTTTGTCTTGAATACTTCAGCATGGAATAATAGAGTAGGACTTT 271
B.capreoli        AGTGTTCACAGCAGACTTTTGTCTTGAATACTTCAGCATGGAATAATAGAGTAGGACTTT 271
B.microti         AGTGTTCACAAACAGGCATTTCGCTTGAATACTACAGCATGGAATAATGAAGTAGGACTTT 298
*****

B.sp.EU1          GGTTCATTTTGTGGTTTGTGAACCTTAGTAATGGTTAATAGGAACGGTTGGGGGCATT 331
B.capreoli        GGTTCATTTTGTGGTTTGTGAACCTTAGTAATGGTTAATAGGAACGGTTGGGGGCATT 331
B.microti         GGTTCATTTTGTGGTTATTGAGCCAGAGTAATGGTTAATAGGAGCAGTTGGGGGCATT 358
*****

B.sp.EU1          CGTATTTAACTGTCAGAGGTGAAATTCCTTAGATTTGTTAAAGACGAACTACTGCGAAAGC 391
B.capreoli        CGTATTTAACTGTCAGAGGTGAAATTCCTTAGATTTGTTAAAGACGAACTACTGCGAAAGC 391
B.microti         CGTATTTAACTGTCAGAGGTGAAATTCCTTAGATTTGTTAAAGACGAACTACTGCGAAAGC 418
*****

```

B.sp.EU1	ATTTGCCAAGGACGTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGA	451
B.capreoli	ATTTGCCAAGGACGTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGA	451
B.microti	ATTTGCCAAGGATGTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGA	478

B.sp.EU1	TACCGTCGTAGTCCTA	467
B.capreoli	TACCGTCGTAGTCCTA	467
B.microti	TACCGTCGTAGTCCTA	494

2.3. Sequenzvergleich des 16S rRNA Gens von *Anaplasma phagocytophilum*

In dieser Studie gefundene Varianten inkl. GenBank Nummern:

P: JX909354

Z: JX909355

A: JX909353

B: JX627369, JX909358

O: JX627370

Y: JX627365, JX627368, JX627372, JX627378, JX909360

I: JX627360, JX627366, JX627373

N: JX627361, JX627374

X: JX627364, JX627367, JX627371, JX627377, JX909359

V: JX627362, JX627375, JX909357

W: JX627363, JX627376, JX909356

➔ als Referenz Sequenz wurde >gi|88606690:c1058902-1057470 *Anaplasma phagocytophilum* HZ, complete genome (NCBI Reference Sequence: NC_007797.1) verwendet: die Nukleotid Positionen zeigen die Positionsnummer im relativen Vergleich zu den 1433 bp des *rrsA* 16S ribosomal RNA Gens [Gene ID:3930754]

P	GTAAAGAATAAGTTAGTGGCAGACGGGTGAGTAATGCATAGGAATCTA	47
Z	ATAAAGAATAAGTTAGTGGCAGACGGGTGAGTAATGCATAGGAATCTA	47
A	ATAAAGAATAAGTTAGTGGCAGACGGGTGAGTAATGCATAGGAATCTA	47
B	ATAAAGAATAAGTTAGTGGCAGACGGGTGAGTAATGCATAGGAATCTA	47
HZ	ATAAAGAATAAGTTAGTGGCAGACGGGTGAGTAATGCATAGGAATCTA	120
O	ATGAGGAATAAGTTAGTGGCAGACGGGTGAGTAATGCATAGGAATCTA	47
Y	ATGAAGAATAAGTTAGTGGCAGACGGGTGAGTAATGCATAGGAATCTA	47
I	ATGAAGAATAAATTAGTGGCAGACGGGTGAGTAATGCATAGGAATCTA	47
N	ATGAAGAATAAATTAGTGGCAGACGGGTGAGTAATGCATAGGAATCTA	47
X	ATGAAGAATAAATTAGTGGCAGACGGGTGAGTAATGCATAGGAATCTA	47
V	ATAAAGGATAAATTAGTGGCAGACGGGTGAGTAATGCATAGGAATCTA	47
W	ATAAAGAATAAATTAGTGGCAGACGGGTGAGTAATGCATAGGAATCTA	47
	* * * * *	
P	CCTAGTAGTATGGGATAGCCACTAGAAATGGTGGGTAATACTGTATAATCCCTGCGGGGG	107
Z	CCTAGTAGTATGGGATAGCCACTAGAAATGGTGGGTAATACTGTATAATCCCTGCGGGGG	107
A	CCTAGTAGTATGGGATAGCCACTAGAAATGGTGGGTAATACTGTATAATCCCTGCGGGGG	107
B	CCTAGTAGTATGGGATAGCCACTAGAAATGGTGGGTAATACTGTATAATCCCTGCGGGGG	107
HZ	CCTAGTAGTATGGGATAGCCACTAGAAATGGTGGGTAATACTGTATAATCCCTGCGGGGG	180
O	CCTAGTAGTATGGGATAGCCACTAGAAATGGTGGGTAATACTGTATAATCCCTGCGGGGG	107
Y	CCTAGTAGTATGGGATAGCCACTAGAAATGGTGGGTAATACTGTATAATCCCTGCGGGGG	107
I	CCTAGTAGTATGGGATAGCCACTAGAAATGGTGGGTAATACTGTATAATCCCTGAGGGGG	107
N	CCTAGTAGTATGGGATAGCCACTAGAAATGGTGGGTAATACTGTATAATCCCTGCGGGGG	107
X	CCTAGTAGTATGGGATAGCCACTAGAAATGGTGGGTAATACTGTATAATCCCTGCGGGGG	107
V	CCTAGTAGTATGGGATAGCCACTAGAAATGGTGGGTAATACTGTATAATCCCTGCGGGGG	107
W	CCTAGTAGTATGGGATAGCCACTAGAAATGGTGGGTAATACTGTATAATCCCTGCGGGGG	107

P	AAAGATTTATCGCTATTAGATGAGCCTATGTTAGATTAGCTAGTTGGTAGGGTAAAGGCC	167
Z	AAAGATTTATCGCTATTAGATGAGCCTATGTTAGATTAGCTAGTTGGTAGGGTAAAGGCC	167
A	AAAGATTTATCGCTATTAGATGAGCCTATGTTAGATTAGCTAGTTGGTAGGGTAAAGGCC	167
B	AAAGATTTATCGCTATTAGATGAGCCTATGTTAGATTAGCTAGTTGGTAGGGTAAAGGCC	167
HZ	AAAGATTTATCGCTATTAGATGAGCCTATGTTAGATTAGCTAGTTGGTAGGGTAAAGGCC	240
O	AAAGATTTATCGCTATTAGATGAGCCTATGTTAGATTAGCTAGTTGGTAGGGTAAAGGCC	167
Y	AAAGATTTATCGCTATTAGATGAGCCTATGTTAGATTAGCTAGTTGGTAGGGTAAAGGCC	167
I	AAAGATTTATCGCTATTAGATGAGCCTATGTTAGATTAGCTAGTTGGTAGGGTAAAGGCC	167
N	AAAGATTTATCGCTATTAGATGAGCCTATGTTAGATTAGCTAGTTGGTAGGGTAAAGGCC	167
X	AAAGATTTATCGCTATTAGATGAGCCTATGTTAGATTAGCTAGTTGGTAGGGTAAAGGCC	167
V	AAAGATTTATCGCTATTAGATGAGCCTATGTTAGATTAGCTAGTTGGTAGGGTAAAGGCC	167
W	AAAGATTTATCGCTATTAGATGAGCCTATGTTAGATTAGCTAGTTGGTAGGGTAAAGGCC	167

P	TACCAAGGCGATGATCTATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGAAGAT	227
Z	TACCAAGGCGATGATCTATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGAAGAT	227
A	TACCAAGGCGATGATCTATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGAAGAT	227
B	TACCAAGGCGATGATCTATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGAAGAT	227
HZ	TACCAAGGCGATGATCTATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGAAGAT	300
O	TACCAAGGCGATGATCTATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGAAGAT	227
Y	TACCAAGGCGATGATCTATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGAAGAT	227
I	TACCAAGGCGATGATCTATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGAAGAT	227
N	TACCAAGGCGATGATCTATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGAAGAT	227
X	TACCAAGGCGATGATCTATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGAAGAT	227
V	TACCAAGGCGATGATCTATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGAAGAT	227
W	TACCAAGGCGATGATCTATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGAAGAT	227

P	ACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTG	287
Z	ACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTG	287
A	ACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTG	287
B	ACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTG	287
HZ	ACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTG	360
O	ACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTG	287
Y	ACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTG	287
I	ACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTG	287
N	ACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTG	287
X	ACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTG	287
V	ACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTG	287
W	ACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTG	287

P	ATCCAGCTATGCCGCTAGAGTGAGGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAACTCTTTTCAGTAGGGA	347
Z	ATCCAGCTATGCCGCTAGAGTGAGGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAACTCTTTTCAGTAGGGA	347
A	ATCCAGCTATGCCGCTAGAGTGAGGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAACTCTTTTCAGTAGGGA	347
B	ATCCAGCTATGCCGCTAGAGTGAGGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAACTCTTTTCAGTAGGGA	347
HZ	ATCCAGCTATGCCGCTAGAGTGAGGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAACTCTTTTCAGTAGGGA	420
O	ATCCAGCTATGCCGCTAGAGTGAGGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAACTCTTTTCAGTAGGGA	347
Y	ATCCAGCTATGCCGCTAGAGTGAGGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAACTCTTTTCAGTAGGGA	347
I	ATCCAGCTATGCCGCTAGAGTGAGGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAACTCTTTTCAGTAGGGA	347
N	ATCCAGCTATGCCGCTAGAGTGAGGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAACTCTTTTCAGTAGGGA	347
X	ATCCAGCTATGCCGCTAGAGTGAGGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAACTCTTTTCAGTAGGGA	347
V	ATCCAGCTATGCCGCTAGAGTGAGGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAACTCTTTTCAGTAGGGA	347
W	ATCCAGCTATGCCGCTAGAGTGAGGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAACTCTTTTCAGTAGGGA	347

P	AGATAATGACGGTACCTACAGAAGAAGTCCCGGCAAACCTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAA	407
Z	AGATAATGACGGTACCTACAGAAGAAGTCCCGGCAAACCTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAA	407
A	AGATAATGACGGTACCTACAGAAGAAGTCCCGGCAAACCTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAA	407
B	AGATAATGACGGTACCTACAGAAGAAGTCCCGGCAAACCTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAA	407
HZ	AGATAATGACGGTACCTACAGAAGAAGTCCCGGCAAACCTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAA	480
O	AGATAATGACGGTACCTACAGAAGAAGTCCCGGCAAACCTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAA	407
Y	AGATAATGACGGTACCTACAGAAGAAGTCCCGGCAAACCTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAA	407
I	AGATAATGACGGTACCTACAGAAGAAGTCCCGGCAAACCTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAA	407
N	AGATAATGACGGTACCTACAGAAGAAGTCCCGGCAAACCTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAA	407
X	AGATAATGACGGTACCTACAGAAGAAGTCCCGGCAAACCTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAA	407
V	AGATAATGACGGTACCTACAGAAGAAGTCCCGGCAAACCTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAA	407
W	AGATAATGACGGTACCTACAGAAGAAGTCCCGGCAAACCTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAA	407

P	TACGGAGGGGGCAAGCGTTGTTTCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCATGTAGGCGGTTTCGG	467
Z	TACGGAGGGGGCAAGCGTTGTTTCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCATGTAGGCGGTTTCGG	467
A	TACGGAGGGGGCAAGCGTTGTTTCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCATGTAGGCGGTTTCGG	467
B	TACGGAGGGGGCAAGCGTTGTTTCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCATGTAGGCGGTTTCGG	467
HZ	TACGGAGGGGGCAAGCGTTGTTTCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCATGTAGGCGGTTTCGG	540
O	TACGGAGGGGGCAAGCGTTGTTTCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCATGTAGGCGGTTTCGG	467
Y	TACGGAGGGGGCAAGCGTTGTTTCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCATGTAGGCGGTTTCGG	467
I	TACGGAGGGGGCAAGCGTTGTTTCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCATGTAGGCGGTTTCGG	467
N	TACGGAGGGGGCAAGCGTTGTTTCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCATGTAGGCGGTTTCGG	467
X	TACGGAGGGGGCAAGCGTTGTTTCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCATGTAGGCGGTTTCGG	467
V	TACGGAGGGGGCAAGCGTTGTTTCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCATGTAGGCGGTTTCGG	467
W	TACGGAGGGGGCAAGCGTTGTTTCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCATGTAGGCGGTTTCGG	467

P	TAAGTTAAAGGTGAAATGCCAGGGCTTAAC	497
Z	TAAGTTAAAGGTGAAATGCCAGGGCTTAAC	497
A	TAAGTTAAAGGTGAAATGCCAGGGCTTAAC	497
B	TAAGTTAAAGGTGAAATGCCAGGGCTTAAC	497
HZ	TAAGTTAAAGGTGAAATGCCAGGGCTTAAC	570
O	TAAGTTAAAGGTGAAATGCCAGGGCTTAAC	497
Y	TAAGTTAAAGGTGAAATGCCAGGGCTTAAC	497
I	TAAGTTAAAGGTGAAATGCCAGGGCTTAAC	497
N	TAAGTTAAAGGTGAAATGCCAGGGCTTAAC	497
X	TAAGTTAAAGGTGAAATGCCAGGGCTTAAC	497
V	TAAGTTAAAGGTGAAATGCCAGGGCTTAAC	497
W	TAAGTTAAAGGTGAAATGCCAGGGCTTAAC	497

2.4. Rohdatentabellen

Tab. 9: Anzahl aller gesammelter *Ixodes ricinus* pro Standort und Monat in den Jahren 2011 und 2012

Habitat	Standort	Jahr	Monat	Anzahl gesammelter Zecken						
				Zecken gesamt	Weiblich	Männlich	Nymphen	Larven		
Parkanlagen	M2	2011	April	273	86	127	60	0		
			Mai	293	76	68	147	2		
			Juni	288	40	47	201	0		
			Gesamt	854	202	242	408	2		
		2012	April	191	63	85	43	0		
			Mai	214	83	93	38	0		
			Juni	150	47	52	51	0		
			Gesamt	555	193	230	132	0		
		M3	2011	April	209	53	50	106	0	
				Mai	318	49	64	204	1	
				Juni	222	55	44	122	1	
				Gesamt	749	157	158	432	2	
	2012		April	156	35	37	84	0		
			Mai	258	78	92	88	0		
			Juni	257	73	59	125	0		
			Gesamt	671	186	188	297	0		
	R1		2011	April	305	120	115	70	0	
				Mai	309	96	71	127	15	
				Juni	388	76	77	217	18	
				Gesamt	1002	292	263	414	33	
		2012	April	197	68	65	64	0		
			Mai	370	107	128	135	0		
			Juni	136	35	52	49	0		
			Gesamt	703	210	245	248	0		
		B	2011	April	287	21	22	244	0	
				Mai	575	50	37	472	16	
				Juni	552	18	12	422	100	
				Gesamt	1414	89	71	1138	116	
	2012		April	238	108	101	26	3		
			Mai	267	82	98	87	0		
			Juni	211	80	65	66	0		
			Gesamt	716	270	264	179	3		
	Gesamt		2011	April	1074	280	314	480	0	
				Mai	1495	271	240	950	34	
				Juni	1450	189	180	962	119	
				Gesamt	4019	740	734	2392	153	
		2012	April	782	274	288	217	3		
			Mai	1109	350	411	348	0		
			Juni	754	235	228	291	0		
			Gesamt	2645	859	927	856	3		
Weide		K	2011	April	236	21	33	182	0	
				Mai	314	39	59	215	1	
				Juni	253	33	59	161	0	
				Gesamt	803	93	151	558	1	
	2012		April	206	39	57	110	0		
			Mai	222	51	41	130	0		
			Juni	200	35	55	109	1		
			Gesamt	628	125	153	349	1		
	Wald		T	2011	April	310	13	16	222	59
					Mai	546	8	20	357	161
					Juni	476	12	10	312	142
					Gesamt	1332	33	46	891	362
2012		April		187	34	43	110	0		
		Mai		307	38	44	170	55		
		Juni		382	37	37	252	56		
		Gesamt		876	109	124	532	111		
Alle Standorte		Gesamt		2011	April	1620	314	363	884	59
					Mai	2355	318	319	1522	196
					Juni	2179	234	249	1435	261
					Gesamt	6154	866	931	3841	516
	2012		April	1175	347	388	437	3		
			Mai	1638	439	496	648	55		
			Juni	1336	307	320	652	57		
			Gesamt	4149	1093	1204	1737	115		
	Beide Jahre		Gesamt	10303	1959	2135	5578	631		

Table 10: Prävalenz von *Babesia* spp. und *Rickettsia* spp. in *Ixodes ricinus*-Zecken pro Monat in 2011 und 2012

Monat	Jahr	Standort	Anzahl untersuchter Zecken ¹⁾				Positive Zecken (%)					
			Zecken gesamt	A		N		Babesia spp.		Rickettsia spp. ²⁾		
				A	N	L pool [n ³⁾]	A	N	L pool [n ³⁾]	A	N	L pool [n ³⁾]
April	2011	Parkanlage	443	283	160	0	3 (1.1)	0	0	24 (8.5)	10 (6.3)	0
		Weide	94	54	40	0	0	0	0	6 (11.1)	8 (20.0)	0
		Wald	128	29	40	13 [59]	1 (3.4)	2 (5.0)	0	2 (6.9)	2 (5.0)	3 [3-14] (5.1-23.7)
		Total	665	366	240	13 [59]	4 (1.1)	2 (0.8)	0	32 (8.7)	20 (8.3)	3 [3-14] (5.1-23.7)
	2012	Parkanlage	461	312	146	1 [3]	0	2 (1.4)	0	nu	nu	nu
		Weide	119	79	40	0	2 (2.5)	0	0	nu	nu	nu
		Wald	114	74	40	0	5 (5.4)	2 (5.0)	0	nu	nu	nu
		Total	694	465	226	1 [3]	6 (1.3)	4 (1.8)	0	nu	nu	nu
Mai	2011	Parkanlage	511	317	160	10 [34]	0	0	0	23 (7.3)	4 (2.5)	1 [1-2] (2.9-5.9)
		Weide	120	79	40	1 [1]	2 (2.5)	2 (5.0)	0	13 (16.5)	5 (12.5)	0
		Wald	108	28	40	8 [40]	0	2 (5.0)	0	6 (21.4)	9 (22.5)	0
		Total	739	424	240	19 [75]	2 (0.5)	4 (1.7)	0	42 (9.9)	18 (7.5)	1 [1-2] (1.3-2.7)
	2012	Parkanlage	478	320	158	0	1 (0.3)	3 (1.9)	0	nu	nu	nu
		Weide	120	80	40	0	1 (1.3)	0	0	nu	nu	nu
		Wald	158	78	40	8 [40]	1 (1.3)	1 (2.5)	1 [1-5] (2.5-12.5)	nu	nu	nu
		Total	756	478	238	8 [40]	3 (0.6)	4 (1.7)	1 [1-5] (2.5-12.5)	nu	nu	nu
Juni	2011	Parkanlage	528	289	180	14 [59]	0	0	0	30 (10.4)	11 (6.1)	1 [1-5] (1.7-8.5)
		Weide	152	92	60	0	2 (2.2)	1 (1.7)	0	11 (12.0)	9 (15.0)	0
		Wald	102	22	40	8 [40]	1 (4.5)	0	0	3 (13.6)	10 (25.0)	0
		Total	782	403	280	22 [99]	3 (0.7)	1 (0.4)	0	44 (10.9)	30 (10.7)	1 [1-5] (1.0-5.1)
	2012	Parkanlage	475	315	160	0	4 (1.3)	2 (1.3)	0	nu	nu	nu
		Weide	116	75	40	1 [1]	0	1 (2.5)	0	nu	nu	nu
		Wald	154	74	40	8 [40]	2 (2.7)	1 (2.5)	1 [1-5] (2.5-12.5)	nu	nu	nu
		Total	745	464	240	9 [41]	6 (1.3)	4 (1.7)	2 [2-10] (4.9-24.4)	nu	nu	nu

1) A=adulte Zecken, N=Nymphsen L=Larven;

2) nu=nicht untersucht

3) n= Anzahl gepoolter Larven

Tab. 11: Gesamtmodell der logistischen Regression mit allen Berechnungen für wirtssuchende Zecken (Entwicklungsstadien, Monat, Jahr, Habitat, Standort)

Variable ¹⁾	p-Wert ²⁾					
	<i>Anaplasma phagocytophilum</i>		<i>Babesia</i> spp.		<i>Rickettsia</i> spp.	
	Gesamt	Gesamt	Gesamt	Gesamt	2011	2011
Larve	-	-	RV	RV	RV	RV
Nymphe	7,73e-12***	6,93e-12***	0,0801.	0,8597.	0,000219***	0,000349***
Adult weiblich	0,88319	0,95286	0,0904.	0,9596.	1,75e-05***	3,16e-05***
Adult männlich	RV	RV	0,3718	0,38292	0,000145***	0,000224***
April	RV	RV	RV	RV	RV	RV
Mai	0,13625	0,18951	0,5723	0,55576	0,992320	0,970862
Juni	0,20582	0,23766	0,6889	0,63508	0,322073	0,420751
2011	RV	RV	RV	RV	-	-
2012	0,00702**	0,00181**	0,1497	0,13804	-	-
Parkanlagen	0,47973	-	1,26e-06***	-	3,50e-05***	-
Weide	0,00216**	-	0,0976.	-	0,483754	-
Wald	RV	-	RV	-	RV	-
Englischer Garten, M2	-	3,30e-09***	-	0,00288**	-	0,633294
Nymphenburg, M3	-	1,36e-11***	-	0,05127.	-	0,000496***
Berg, B	-	3,08e-12***	-	0,00459**	-	0,447776
Dörnbergpark, R1	-	RV	-	-	-	RV
Kerschlach, K	-	2,45e-13***	-	0,09956.	-	6,26e-05***
Tussenhausen, T	-	7,78e-07***	-	RV	-	2,76e-05***

1) RV=Referenzvariable

2) Signifikanz-Codes: 0‘***‘0,001‘**‘0,01‘*‘0,05‘.‘0,1‘‘1

Tab. 12: Simultaner paarweiser Test auf Unterschiede der Mittelwerte mit Tukey Kontrasten für wirtssuchende Zecken (Entwicklungsstadien, Monate, Habitate, Standorte)

Variable	p-Wert ¹⁾		
	<i>A. phagocytophilum</i>	<i>Babesia</i> spp.	<i>Rickettsia</i> spp.
	Gesamt	Gesamt	2011
M-L=0	-	0,798	<0,01***
N-L=0	-	0,281	0,00107**
W-L=0	-	0,310	<0,001***
N-M=0	<1e-06***	0,413	0,96208
W-M=0	0,988	0,464	0,58318
W-N=0	<1e-06***	1,000	0,27300
Weide-Wald=0	0,00573**	0,2215	0,760353
Parkanlagen -Wald=0	0,75226	<0,001***	0,000111***
Parkanlagen -Weide=0	<0,001***	0,0181*	0,000156***
Juni-April=0	0,415	0,915	0,583
Mai-April=0	0,296	0,839	1,000
Mai-Juni=0	0,975	0,984	0,570
M2-R1=0	<0,001***	-	0,99682
K-R1=0	<0,001***	-	<0,001***
M3-R1=0	<0,001***	-	0,00626**
B-R1=0	<0,001***	-	0,97323
T-R1=0	<0,001***	-	<0,001***
K-M2=0	0,04582*	0,1244	<0,001***
M3-M2=0	0,81243	0,1719	0,00164**
B-M2=0	0,01154*	0,6472	0,83438
T-M2=0	0,99898	0,0210*	<0,001***
M3-K=0	0,47567	0,9973	0,98218
B-K=0	0,97014	0,4783	0,03149*
T-K=0	0,02715*	0,4413	0,98535
B-M3=0	0,16059	0,6522	0,12444
T-M3=0	0,64573	0,2688	0,80511
T-B=0	0,00642**	0,0324*	0,01107*

1) Signifikanz-Codes: 0‘***‘0,001‘**‘0,01‘*‘0,05‘.‘0,1‘‘1

Tab. 13: Berechnung signifikanter Unterschiede (Exakter Test nach Fisher und Binomialtest) für wirtssuchende Zecken und Rehproben am Wald-Standort (gesaugte Zecken, Blut-, Milz- und Hautproben, Geschlecht, Alter, Erreger)

Variable	p-Wert ¹⁾		
	<i>A. phagocytophilum</i>	<i>Babesia</i> spp.	<i>Rickettsia</i> spp.
	Gesamt	Gesamt	Gesamt
Adulte wirtssuchende Zecken - wirtssuchende Nymphen ²⁾	0,007069*	1	0,5585
Gesaugte Zecken - wirtssuchende Zecken ²⁾	2,2e-16*	0,09116	0,6137
Zecke männlich gesaugt - Zecke männlich wirtssuchend ²⁾	9,827e-11*	0,05498	0,7984
Zecke weiblich gesaugt - Zecke weiblich wirtssuchend ²⁾	<2,2e-16*	0,5748	1
Rehproben: Blut - Milz ³⁾	0,4028	0,7465	-
Rehproben: Haut - Milz ³⁾	6,559e-09*	-	-
Rehproben: Haut - Blut ³⁾	1,448e-07*	-	-
Rehproben: Geschlecht männlich - Geschlecht weiblich ²⁾	1	0,3404	-
Rehproben: Altersklassen (<1 - >2 - 1-2) ²⁾	1	0,07263	-
Rehproben: Erreger <i>A. phagocytophilum</i> - <i>Babesia</i> spp. ²⁾	1	1	-

1) Signifikanz-Codes: * < 0,05

2) Exakter Test nach Fisher

3) Binomialtest

XIII. DANKSAGUNG

In diesem Kapitel möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mich während der letzten Jahre bei den praktischen, theoretischen und psychischen Aufgaben, die zum Entstehen dieser Arbeit notwendig waren, auf unterschiedlichste Art und Weise unterstützt haben.

Mein besonderer Dank geht an Herrn Prof. Dr. Kurt Pfister, der mir sehr überraschend die Möglichkeit eröffnet hat, diese Dissertation am Lehrstuhl für Vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie unter seiner Obhut anzufertigen und mich über den gesamten Zeitraum sehr freundlich und menschlich betreut hat.

Als nächstes möchte ich mich ganz besonders bei meiner Betreuerin PD Dr. Cornelia Silaghi bedanken, die außerordentlich fachlich kompetent, sehr motiviert und interessiert den Fortgang meiner Arbeit begleitet hat. Ganz besonders danken möchte ich ihr für die Unterstützung bei meiner Teilnahme an Fachtagungen und die unglaublich zeitnahe, intensive und geduldige Korrektur der Manuskripte und meiner Dissertation.

Großer Dank gilt Claudia Thiel, die mich zügig in die notwendigen Arbeitsabläufe im Labor eingelernt hat und mir eine enorme Entlastung beim Bewältigen der unglaublichen Mengen an Probenmaterial war und Tim Tiedemann, der uns dabei tatkräftig unterstützt hat.

Ein herzlicher Dank geht an alle Mitarbeiter des Diagnostiklabors, allen voran an Andrea Mihalkov und Ute Maurer, die zuverlässig die „Erstversorgung“ der eingehenden Rehproben vorgenommen haben und mir so eine immense Hilfe waren. Auch bedanke ich mich bei allen weiteren Mitarbeitern des Lehrstuhls für Vergleichenden Tropenmedizin und Parasitologie, die sich stets kollegial, extrem hilfsbereit und überaus freundlich mir gegenüber verhalten haben und Interesse am Fortgang meiner Arbeit zeigten.

Außerdem danke ich ganz besonders Herrn Georg Böck jr., der durch die zuverlässige und gewissenhafte Entnahme der Rehproben zu einer umfassenden Probensammlung und damit zum zügigen Gelingen dieser Dissertation beigetragen hat.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Frau Monia Mahling und Frau Ingrid Herb vom Statistischen Beratungslabor der Ludwig-Maximilian-Universität München für die geduldige statistische Analyse meiner Daten.

Der Europäischen Union danke ich für die Finanzierung der notwendigen Arbeiten im Zusammenhang mit dem EU-Projekt EDENext.

Ganz besonderer Dank geht an meinen Mann Martin und meine Familie und Freunde, die mir nicht nur während der letzten Jahre des Studiums und der Doktorarbeit eine enorme Unterstützung waren und mich stets motiviert und mir Kraft gegeben haben.